

Aus dem Institut für Klinische Physiologie im Klinikum Steglitz
der Freien Universität Berlin

DIE HYDRAULISCHE LEITFÄHIGKEIT VON ISOLIERTEN AMPHIBIENMEMBRANEN UNTER DER EINWIRKUNG VON NEBENNIERENRINDENSTEROIDEN

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Medizinischen Doktorwürde

an den Medizinischen Fachbereichen

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Roland Müller-Suur

aus Allenstein

1972

Aus dem Institut für Klinische Physiologie im Klinikum Steglitz
der Freien Universität Berlin

DIE HYDRAULISCHE LEITFÄHIGKEIT VON ISOLIERTEN AMPHIBIENMEMBRANEN UNTER DER EINWIRKUNG VON NEBENNIERENRINDENSTEROIDEN

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Roland Müller-Suur

aus Allenstein

Referent: Prof. Dr. K. Hierholzer

Correferent: Prof. Dr. O. H. Gauer



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fachbereiche der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 4. September 1972

Inhaltsverzeichnis

Seite

Einleitung	3
------------	---

Versuchstiere und Methodik

a) Versuchstiere	4
b) Präinkubation	5
c) Permeabilitätsmessungen	8
d) Badlösungen und Hormone	13

Ergebnisse

A) Ansprechbarkeit von Froschhäuten auf Vasopressin	15
B) Ansprechbarkeit von Krötenblasen und -häuten auf Vasopressin	19
C) Präinkubation isolierter Membranen von Bufo marinus zur Auswaschung von Corticosteroiden	19

D) Wirkung von Corticosteroiden auf die hydraulische Leitfähigkeit von isolierten Membranen (<i>Bufo marinus</i>)	
a) Kontrollphase	25
b) Verabreichung von Corticosteroiden zur Inkubationsflüssigkeit	29
1) Anisotone Inkubation	29
2) Isotone Inkubation	31
3) Isotone Inkubation mit gleichzeitiger Theophyllinstimulierung	31
4) Isotone Inkubation nach Stimulation der Membran durch Aldosteron	34

Diskussion	39
------------	----

Zusammenfassung	50
-----------------	----

Einleitung

Nebennierenrindenhormone (NNRH) beeinflussen nicht nur Aufnahme, Verteilung und Ausscheidung von Elektrolyten, sondern sie wirken auch auf den Wasserhaushalt ein. Besonders deutlich zeigt sich diese Wirkung nach Ausfall der NNR-Funktion. Es entwickelt sich eine Störung der Wasserausscheidungsfähigkeit der Nieren, die durch Hormone mit glucocorticoider Aktivität aufgehoben werden kann (Gaunt et al. (1949), Gaunt (1951), Gaunt and Chart (1962), Peters (1960)).

Stolte et al. (1968) benutzten Mikropunktionsmethoden, um den Mechanismus dieser Wasserausscheidungsstörung aufzuklären. Es konnte gezeigt werden, daß bei NNR-insuffizienten Ratten die osmotische Wasserpermeabilität der distalen Tubulismembranen erhöht ist. Durch diese Veränderung, die durch Cortison und Dexamethason normalisiert werden konnte, fließt Tubulusflüssigkeit vermehrt durch das Epithel in das Blut zurück. Stolte et al. (1968) konnten zeigen, daß die Permeabilitätsänderung auf distale Tubulismembranen beschränkt ist und durch Aldosteron in physiologischen Dosen nicht beeinflußt wird. Als wahrscheinlicher Mechanismus ist "eine direkte von ADH unabhängige Permeabilitätsänderung der distalen Tubuluszellen unter dem Einfluß von Glucocorticoiden anzusehen."

Diese Arbeit war der Ausgangspunkt für die vorliegenden Experimente. Wir stellten uns die Frage, ob die Steuerung der Wasserpermeabilität von epithelialen Membranen durch NNR-Steroide mit glucocorticoider Aktivität ein allgemeines, biologisches Prinzip darstellt, vergleichbar der in der Tierreihe nachweisbaren Wirkung von Vasopressin und seinen Analogen. Da in der Literatur die Möglichkeit diskutiert wird, daß die nach NNR-Ausfall auftretenden Permeabilitätsstörungen durch ADH-Änderungen bedingt sind (Dingman & Despointes (1960), Peters (1960), Gaunt & Chart (1962), Ahmed et al. (1967)), wählten wir als biologisches Modell isolierte Amphibienmembranen, bei denen der Einfluß von NNR- und HHL-Hormonen kontrolliert und getrennt untersucht werden kann.

Wir entwickelten eine Kammer zur volumetrischen Messung des osmotischen Wasserflusses im geschlossenen System bei kontinuierlicher Begasung. Geprüft wurden die Hormone Cortisol, Dexamethason und Aldosteron und vereinzelt auch Corticosteron. Als geeignetes Versuchstier erwies sich *Bufo marinus*. Obwohl die untersuchten Membranen (Bauchhäute und Urinblasen) sowohl auf ADH, Theophyllin und Aldosteron in typischer Weise reagierten, konnten wir keinen direkten Effekt von NNR-H mit glucocorticoider Aktivität auf die Wasserpermeabilität nachweisen. Dagegen konnte gezeigt werden, daß ADH in Anwesenheit von Aldosteron und Dexamethason eine stärkere Wirkung entfaltet als in präinkubierten steroidverarmten Membranen.

Versuchstiere und Methodik

a) Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden Frösche (*Rana esculenta*) und Kröten (*Bufo bufo* und *Bufo marinus*) benutzt. Die Frösche stammten aus Deutschland. *Bufo bufo* wurde aus Griechenland und *Bufo marinus* aus Kolumbien bezogen. Die Tiere wurden bei Zimmertemperatur auf feuchtem Moos gehalten. Sie hatten freien Zugang zu Leitungswasser. Die Kröten wurden in vierzehntägigem Abstand mit Mehlwürmern gefüttert. Die Frösche, die nur zu Vorversuchen verwendet wurden, waren nicht vorbehandelt. Um die endogene Sekretion von Aldosteron zu senken und damit die Sensibilität der Membran gegenüber Corticoiden zu erhöhen (Crabbé 1961a, Crabbé 1961b, Porter & Edelman 1964, Sharp & Leaf 1964, Crabbé und de Weer 1965) wurden die Kröten 48 Stunden vor den Versuchen in 0,65 % Kochsalzlösung aufbewahrt.

Für die Permeabilitätsmessungen wurden die Bauchhäute (vgl. Ussing, 1951) und die Urinblasen der Tiere (vgl. Leaf et al. 1958) benutzt. Nach Dekapitation wurde das Rückenmark zerstört.

Zunächst wurde die Bauchhaut von der Unterlage abpräpariert und durch Mittelschnitt in zwei gleichgroße Lappen unterteilt. Die Urinblasen (Abb.1) bestehen aus zwei miteinander in der Mittellinie verbundenen Säcken, die bei *Bufo marinus* im gefüllten Zustand bis zu 40 ml Urin enthalten können und sich dann im Bauchraum bis zur Höhe des Brustbeines erstrecken. Die beiden Halbbblasen wurden in der Mittellinie voneinander abgetrennt und jede einzelne seitlich aufgeschnitten, so daß zwei etwa gleichgroße Lappen entstanden.

b) Präinkubation

Die so gewonnenen Membranen wurden daraufhin über 12 Stunden präinkubiert, um den endogenen Steroidgehalt des Gewebes herabzusetzen (Sharp & Leaf (1964), Porter & Edelman (1964), Bentley (1968)). Die Präinkubation erfolgte in substratfreier Froschringerlösung (s.u.). Wir wählten dabei im Prinzip sowohl die Methode von Bentley (1968), bei der das Gewebe in 60 ml Ringerlösung bei 2° C im Warburg-Inkubationsschüttler aufbewahrt wurde, als auch die Methode von Porter & Edelman (1964), bei der die Membranen in 5 ml Ringerlösung bei Zimmertemperatur inkubiert werden. Dieses Verfahren wurde auch von Ferguson et al. (1968) und von Handler et al. (1969) verwendet. Bei einer Amplitude von 2 cm betrug die Schüttelfrequenz in beiden Fällen 72/min. Ein unterschiedlicher Effekt beider Methoden konnte nicht nachgewiesen werden.

Um einen Anhalt über den Effekt der Präinkubation auf die Steroidkonzentration des Gewebes zu erhalten, wurde bei 2 Kröten (*Bufo marinus*) die Auswaschung von radioaktiv markierten Cortisol aus den isolierten Membranen gemessen. ⁺

⁺ Herrn Priv.Doiz.Dr.Gerhards danken wir für die Möglichkeit, daß wir diese Bestimmungen in seinem Laboratorium durchführen konnten.

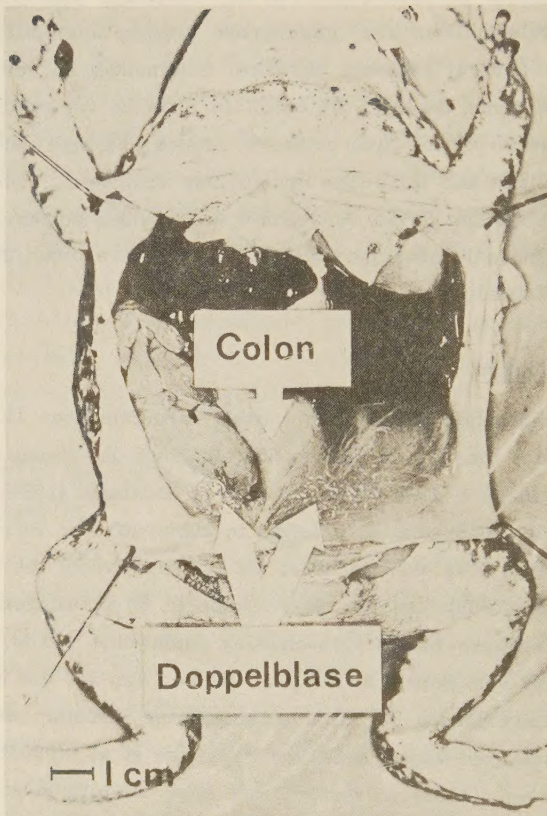


Abb. 1

Anatomischer Situs des Peritonealraumes der Kröte *Bufo marinus*.

Nach Eröffnung der Bauchdecke durch einen Medianschnitt werden die beiden Hälften der Urinblase sichtbar, die mit klarem Urin gefüllt sind. Zwischen der Doppelblase liegt das Colon. Cranial davon sieht man die dunkel gefärbte Leber und darüber das Brustbein.

Wir verwendeten dazu ^3H -markiertes Cortisol (spezifische Aktivität : 100 mC/mg).

Jedes Tier erhielt 50 μC Cortisol (10.5 γ gelöst in 0.1 ml Äthanol und verdünnt mit Ringer 1 : 10) intraperitoneal injiziert. 15 und 30 Minuten nach der Verabreichung des Hormons wurde je 1 Tier dekapitiert. Die unmittelbar danach präparierten Häute und Blasenhälften wurden mit einer Stanze in gleichgroße Teile von 1 cm² zerteilt. Diese wurden mit Filterpapier abgetupft und gewogen. Zunächst wurde die spezifische Aktivität von je zwei Membranteilen bestimmt; bei Blasen erfolgte die Aktivitätsmessung an jeweils einem linken und rechten Membranteil. Dazu wurde je ein Membranteil mit 2 ml Methanol versetzt. 15 Minuten danach wurde 0.5 ml Ringerlösung und 18 ml Zählflüssigkeit dazugegeben und anschließend daran die Aktivität im Liquid-Szintillations-Spektrometer gemessen. Für die Bestimmung der Aktivität im Inkubationsmedium wurden 0.5 ml mit 2 ml Methanol und 18 ml Zählflüssigkeit versetzt und darin die Aktivität bestimmt. Die übrigen Membranen wurden einzeln in Warburg-Gefäßen inkubiert, die mit 5 ml Ringerlösung beschickt waren. Aktivitätsmessungen erfolgten an entsprechenden Membranteilen nach 30 Minuten 1, 2, 4 und 8 Stunden. Gleichzeitig wurde die spezifische Aktivität der Inkubationslösungen gemessen.

Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte in einem Liquid-Szintillations-Spektrometer ("Packard"). Die Zählflüssigkeit hatte folgende Zusammensetzung : 400 g Naphtalin, 40 g PPO, 1000 ml POPOP, 4000 ml Dioxan.

Die Proben wurden entweder 5 Minuten lang oder bis zu 20 000 cpm gezählt. Messeffekte, die oberhalb 3 σ der Streuung des Null-effektes lagen, wurden als signifikant unterschiedlich vom Null-effekt angesehen.

c) Permeabilitätsmessungen

Als Maß der osmotischen Wasserpermeabilität wurde der durch einen osmotischen Gradienten verursachte Volumenfluß durch die Membranen bestimmt.

Hierzu wurde eine für volumetrische Messungen geeignete Apparatur konstruiert, die eine Begasung und Mischung des Systems ohne Volumenverschiebung erlaubt. Wie in Abb.2 und 3 dargestellt, besteht sie aus zwei zylindrischen Plexiglaskammern, zwischen welche die biologischen Membranen eingespannt wurden. Der innere Kammerdurchmesser beträgt 2 cm, die Membranfläche dementsprechend 3.14 cm^2 . Jede Kammer hat ein Volumen von 12.0 ml. Am Boden der Kammer befindet sich eine Einsenkung mit einem plastiküberzogenen Eisenkern, der durch einen außerhalb befindlichen Magnetrührer bewegt wird und die Kammerflüssigkeit durchmischt. Die Drehzahl wurde mit 78/min so gewählt, daß die Temperatur der Badlösungen während der Versuche um weniger als $2 \times 10^{-2} \text{ }^{\circ}\text{C}$ anstieg. Die Temperatur wurde mit einem elektronischen Temperaturmeßgerät (Knauer, Typ "Universal-Temperatur-Meßgerät") gemessen.

Der Zustrom und Abstrom von Flüssigkeit erfolgte über μl -Pipetten, die über einen Glashahn mit einem Nachfüllreservoir verbunden waren und über Normalschliffe in die Kammern eingesetzt wurden. Die Begasung der Badlösungen erfolgte über Polyäthylenschläuche, die ebenfalls mit Hilfe von Glasschliffen dicht in die Kammern eingebracht wurden. Das Material (Polyäthyl "Hoechst") besitzt eine ausreichende Permeabilität für O_2 und CO_2 , so daß die Zu- und Abfuhr beider Gase durch Diffusion erfolgen konnte. Um eine genügend große Diffusionsoberfläche zu erhalten, wurde ein Polyäthylenschlauch über der Flamme auf einen Durchmesser von ca. 0.5 mm ausgezogen und von diesem Material ein ca. 1 Meter langes Stück in jede der beiden Kammern eingebracht. Beide

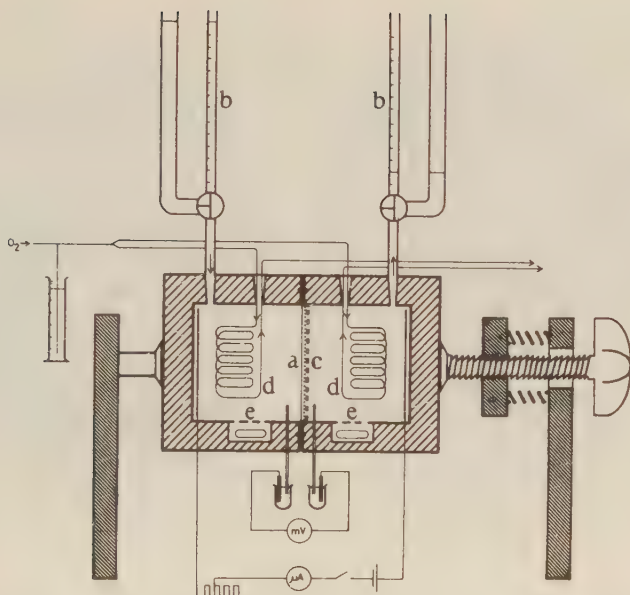


Abb. 2

Schematische Darstellung der Kammer zur volumetrischen Messung des Wasserflusses und zur Registrierung von Kurzschlußstrom und Potentialdifferenz bei gleichzeitiger Begasung und Mischung der Flüssigkeiten. Die Membran (a) ist zwischen zwei zylindrische Plexiglaskammern bei konstantem Federdruck eingespannt (serosale Seite rechts). Die Kammerhälften sind nach oben durch die kalibrierten Pipetten (b) verschlossen. Der Meniskus der mukosalen Seite wird über den Glashahn 10 cm über den der serosalen Seite eingestellt, so daß die Membran dem Nylonstütznetz (c) anliegt. Beide Kammern wurden über Polyäthylenschläuche (d) per diffusionem mit einem wasserdampfgesättigten Gasgemisch (50 % mit 50 % N_2) begast. Die Durchmischung erfolgte auf beiden Seiten magnetisch über Eisenkerne, die am Boden jeder Kammer eingelassen waren (e).

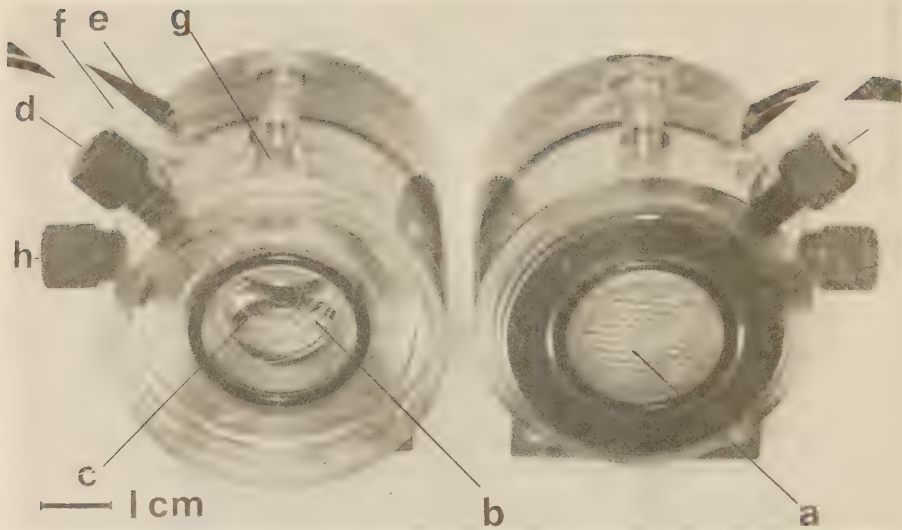


Abb. 3

Ansicht der Stirnseiten der rechten (serosalen) und linken (mukosalen) Kammerhälften. Die serosale Kammerhälfte ist mit einem Korkring versehen, der zur Fixierung der Urinblasen mit Hilfe von Igelstacheln dient. Rechts ist durch das Nylonnetz (a) hindurch die durchlöchernte Plexiglasstützscheibe zu sehen. Im Innern der linken Kammerhälfte ist ein feiner Polyäthylenschlauch (b) zur Begasung der Badeflüssigkeit sichtbar. Am Boden der linken Kammerhälfte sieht man außerdem eine durchlöchernte Schutzscheibe (c), die sich über dem Eisenkern des Magnetrührers befindet. Neben den nach oben gerichteten Einlässen der KCl-Brücken (d), der Kabel für die Silber-Silberchlorid-Elektrodenplatten (e), des Begasungssystems (f) und der Normschliffe für Pipetten (g), sind die horizontal angebrachten Einlässe (h) für die Injektion von Testsubstanzen angebracht.

Systeme wurden mit wasserdampfgesättigtem Gasgemisch (50 % O_2 mit 50 % N_2) durchströmt. Die Rate wurde dabei so bemessen, daß der Sauerstoffpartialdruck während der Versuche den Wert von 150 Torr nicht unterschritt. Der Sauerstoffperforationsdruck wurde durch eine Überlauffanordnung (vgl. Abb. 2) konstant auf 45 cm H_2O eingestellt. Die Kontrolle des Sauerstoffpartialdruckes der Badlösungen erfolgte mit einem Gasanalysator (Beckman Physiological Gasanalyzer, Model 160).

Im übrigen enthielten beide Kammern membranernahe Zuleitungen für KCl-Angarbrücken (5 mm Abstand von der Membran) und membranferne Silber-Silberchlorid-Elektrodenplatten von 2 cm Durchmesser. Die serosale Kammerhälfte besaß an der Stirnseite einen Korkring (Abb. 3), auf dem die zu untersuchende Membran mit Hilfe von Igelstacheln befestigt werden konnte. Dobson und Kidder (1968) und Nutbourne (1968) hatten darauf hingewiesen, daß die Größe des Einspannungsdruckes die elektrischen Parameter der Membranen beeinflußt. Deshalb wurde in unseren Experimenten der Versuch unternommen, den Einspannungsdruck im Augenblick des Zusammenschraubens der Kammerhälften konstant zu halten. Dies wurde bewerkstelligt dadurch, daß beide Kammerhälften durch Spannschrauben zusammengehalten wurden, die über Anschlagfedern einen konstanten Einspannungsdruck gewährleisteten (Abb. 2 und Abb. 4). Wie auf Abb. 3 zu sehen ist, befand sich in der Kammer, die der serosalen Membranseite zugewandt war, ein von einer Plexiglasscheibe gestütztes Nylonnetz, welches der Membran als Auflage diente und bei einem osmotischen Wasserfluß von mucosal nach serosal eine Dehnung und Ausbuchtung der Membran verhinderte. Nur so können Volumenflüsse von einer zur anderen Kammer exakt ermittelt werden.

Nachdem die isolierten und präinkubierten Membranen (Froschhäute, Krötenhäute und Krötenblasen) zwischen die beiden Kammern eingespannt worden waren, wurde unmittelbar darauf Froschringer-

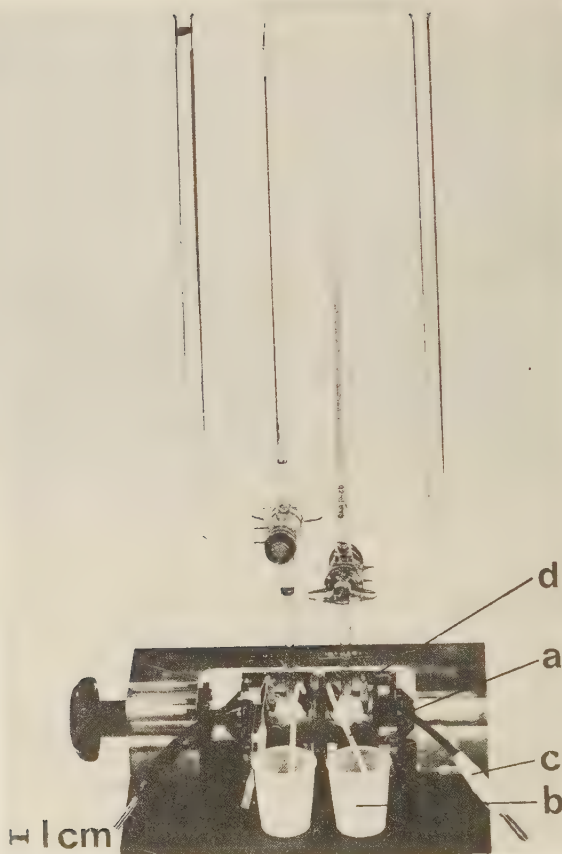


Abb. 4

Ansicht der Meßanordnung. Die beiden Kammerhälften sind eingespannt. Die Pipetten sind aufgesetzt, wobei der Meniskus der linken (mukosalen) Pipette ca. 10 cm über dem der rechten (serosalen) Pipette eingestellt ist. Die beiden KCl-Brücken (a) zur Messung der transepithelialen Potentialdifferenz tauchen in KCl-gefüllte Becher (b), in die die Kalomelhalbelemente (nicht sichtbar) eintauchen. Weiterhin sind die Anschlüsse der Silber-Silberchloridplatten (c) sowie des Begasungssystems (d) sichtbar.

lösung in die serosale und 1/10 Froschringerlösung in die mucosale Kammer eingefüllt. Die osmotische Konzentrationsdifferenz betrug 225 mosmol/kg (serosal hyperton). Sie bewirkte einen Wasserfluß von mucosal nach serosal der in 15-minütigem Abstand volumetrisch bestimmt wurde. Durch gleichzeitige Ablesung an der zuführenden und abführenden μ l-Pipette konnte dabei die Dichtigkeit des Systems geprüft werden. Über die Glashähne wurde dabei jeweils der Meniskus der mucosalen Seite 10 cm über den der serosalen Seite eingestellt, so daß die Membran mit einem geringen Wasserdruck an das Nylonstütznetz angedrückt wurde, auch dann wenn, wie unten beschrieben, keine osmotische Druckdifferenz einwirkte. Die hydrostatische Druckdifferenz von 10 cm H_2O entspricht einer osmotischen Druckdifferenz von 0,5 mosmol/kg und ist somit gegenüber der vorliegenden Konzentrationsdifferenz von 225 mosmol/kg zu vernachlässigen.

Die transepitheliale elektrische Potentialdifferenz und der Kurzschlußstrom wurden nach dem von Ussing und Zehran (1951) angegebenen Verfahren gemessen. Die Spannung wurde mit Kalomel-Halbzellen abgegriffen und auf einem Millivoltmeter (Knick, Typ 350) abgelesen, bzw. über einen Direktschreiber (Physioscript "Schwarzer" und 4-Kanal-Kompensationsschreiber "Linseis") registriert. Der Kurzschlußstrom, dessen Größe unter den anisotonen Versuchsbedingungen nicht mit dem aktiven Na-Transport gleichgesetzt werden kann, wurde in 15-minütigen Intervallen über ein Mikroamperemeter (Jennen Electronics Amsterdam) gemessen. Als Stromquelle benutzten wir eine Trockenbatterie (Varta Petrix 212 Mono).

d) Badlösungen und Hormone

Zur Füllung der serosalen Kammer verwendeten wir eine Froschringerlösung folgender Zusammensetzung: NaCl 111 mM; KCl 3.45 mM; $CaCl_2$ 0.45 mM; $MgCl_2$ 1.5 mM; KH_2PO_4 1.9 mM; Na_2HPO_4 8.1 mM; Glucose 11 mM; pH 7.4. Die Osmolalität dieser Lösung wurde mit einem Osmometer ("Knauer") kryoskopisch bestimmt. Sie betrug

*) (begast)

250 mosmol/kg. Zur Füllung der mukosalen Kammer wurde die Ringerlösung mit Aqua destillata auf 25 mosmol/kg verdünnt.

Folgende Hormonpräparate wurden verwandt:

Cortisol,* kristallin (Schering), welches in Äthanol (5 mg/ml) gelöst und unmittelbar vor der Verwendung mit Ringerlösung verdünnt wurde;

Corticosteron,* kristallin (Schering), welches ebenso wie Cortisol gelöst und verdünnt wurde;

Dexamethason,* kristallin (Schering), welches ebenso wie Cortisol gelöst und verdünnt wurde;

Dexamethason* - Hemisulfatnatrium, fertige Injektionslösung (Schering "Dexascheron"), 6.3 mg/ml (entspr. 5 mg/ml Dexamethason).

Die beiden Hormonarten zeigten keinen unterschiedlichen Effekt.

Deshalb wird auf eine getrennte Darstellung verzichtet.

Aldosteron, fertige Injektionslösung (Ciba "Aldocorten"), 0.5 mg/ml die mit Ringerlösung 1 : 500 verdünnt wurde.

Antidiuretisches Hormon, fertige Injektionslösung (Parke-Davis "Pitressin,") 20 U/ml.

Die Endkonzentrationen in der Badlösung betrugen: Cortisol 10^{-4} und 10^{-5} M, Dexamethason 10^{-5} und 10^{-8} M, Aldosteron 10^{-7} M, ADH 200 mU/ml.

In einigen Versuchen wurde der Badlösung Theophyllin (Merck) zugesetzt. Es wurde 30 Minuten vor der Verabreichung in Ringerlösung gelöst, die Endkonzentration betrug 10^{-2} M.

* Herrn Priv. Doz. Dr. Gerhards, c/o Fa. Schering, danken wir für die Überlassung von Versuchsmengen.

Ergebnisse

Ansprechbarkeit von Froschhäuten auf Vasopressin

In einer ersten Versuchsreihe, die bereits 1967 durchgeführt wurde, untersuchten wir die Ansprechbarkeit von Froschhäuten auf Vasopressin.

Der Versuchsablauf war folgender:

Die Bauchhäute von unbehandelten Fröschen (*R. esculenta*) wurden unmittelbar nach der Präparation oder nach einer Präinkubationsphase in die Kammer eingebracht. Auf der serosalen Seite befand sich Ringerlösung, auf der mukosalen Seite 1 : 10 bzw. 1 : 2 verdünnte Ringerlösung. Zunächst wurden die transmembranale Potentialdifferenz und der Wasserfluß während einer 60-minütigen Vorphase gemessen. Danach erfolgte die Verabreichung von Vasopressin zur serosalen Badlösung. Die experimentelle Phase wurde auf 120 Min. ausgedehnt.

In Abb.5 sind die Ergebnisse der Potentialmessungen aufgetragen. Die in der Vorperiode gemessenen Werte variierten zwischen 15 und 100 mV, wobei die niedrigsten Werte an den präinkubierten Häuten registriert wurden. Ein deutlicher und über die experimentelle Phase anhaltender Anstieg der Potentialdifferenz nach Vasopressin wurde nur in einem Experiment (vom 12.1.68) beobachtet. Die bei denselben Häuten gemessenen Wasserflüsse sind in Tab.1 dargestellt. Während die unvorbehandelten Membranen auf ADH nicht reagierten, stieg der Wasserfluß durch die präinkubierten Häute in drei von vier Versuchen an. Wegen dieser geringen Ansprechbarkeit wurde auf weitere Versuche mit Steroiden an Fröschen verzichtet und auf Kröten (*Bufo bufo* und *Bufo marinus*) übergegangen.

Es ist jedoch darauf hinzuweisen, daß eine Wiederholung der Vasopressinversuche an *Rana esculenta*, die zwei Jahre später an Tieren unmittelbar nach der Lieferung durchgeführt wurden, deutlichere Effekte sowohl auf die Potentialdifferenz (Abb.6) als auch auf die Wasserflüsse

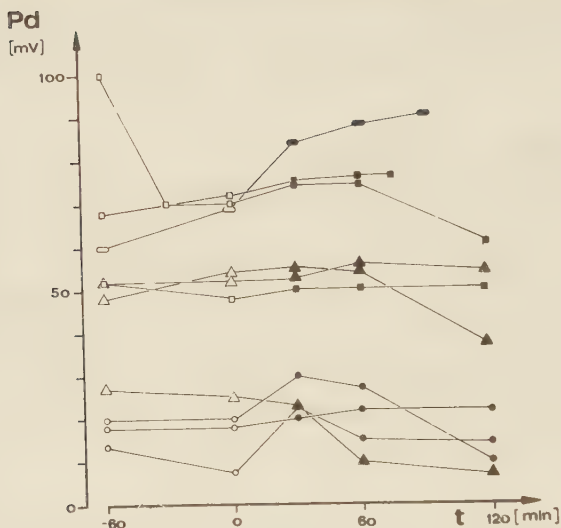


Abb. 5

Zeitlicher Verlauf der transepithelialen Potentialdifferenz (in mV) nach Gabe von Vasopressin (200 mU/ml) an Bauchhäuten von Fröschen der Lieferung von 1968. Offene Symbole stellen die Werte vor ADH-Gabe, geschlossene Symbole die nach ADH-Gabe dar.

- △ nicht präinkubierte Häute mit mukosal 1 : 2 verdünntem Ringer
- nicht präinkubierte Häute mit mukosal 1 : 10 verdünntem Ringer
- mehr als 10 Std. präinkubierte Häute 1 : 2 verdünntem Ringer mit mukosal
- mehr als 10 Std. präinkubierte Häute 1 : 10 verdünntem Ringer mit mukosal

Datum	Kontrolle [ul/F · h]	maximale Steigerung in der exp. Phase [ul/F · h]	Δ %	
nicht präincubierte Häute				Ringer/1:2 verd. Ringer
11.07.67	19	17	- 10	
7.12.67	14	15	+ 7	
8.12.67	12.5	17	+ 40	
nicht präincubierte Häute				Ringer/1:10 verd. Ringer
3.01.68	35	25	- 28	
2.01.68 *	37	36	- 3	
	36	35	- 3	
10.01.68	40	38	- 6	
>10 h präincubierte Häute				Ringer/1:2 verd. Ringer
30.05.67	32.5	52	+ 61	
27.11.67	4	12	+200	
7.12.67	8	5	- 37.5	
>10 h präincubierte Häute				Ringer/1:10 verd. Ringer
12.01.68	23	37	+ 60	

*) siehe auch Abbildung 7

Tab. 1 ADH-Effekt auf die Lp von Froschhäuten (Lieferung 1967)

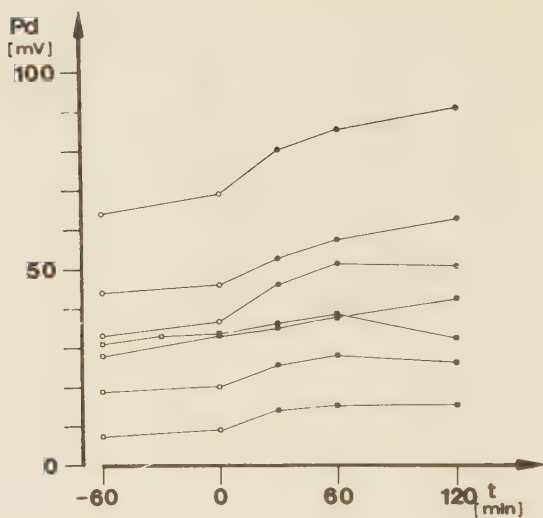


Abb. 6

Zeitlicher Verlauf der transepithelialen Potentialdifferenz (in mV) nach Gabe von Vasopressin (200 mU/ml) an Bauchhäuten von Fröschen der Lieferung von 1970.

Offene Symbole stellen die Werte vor ADH-Gabe dar, geschlossene Symbole die nach ADH-Gabe dar.

○ nicht präinkubierte Häute

□ mehr als 10 Stunden präinkubierte Häute.

In allen gezeigten Versuchen wurde mukosal 1:10 verdünnte Ringer-Lösung eingefüllt.

(Tab.2) ergab. Offenbar variiert die Ansprechbarkeit von Tieren verschiedener Lieferungen trotz gleicher Herkunft. Zwei Versuche vom 5.1.68 und 12.11.70 sind zum Vergleich in Abb.7 dargestellt. Den Wasserfluß der 12 Std. präinkubierten Bauchhaut vom 12.11.70 ergab bei kumulativer Auftragung eine konstante Steigung von 28 $\mu\text{l/h}$; 30 Min. nach Verabreichung von Vasopressin nahm der Wasserfluß zu und erreichte nach der ersten Stunde der experimentellen Phase einen neuen Wert von 72 $\mu\text{l/h}$.

Ansprechbarkeit von Krötenblasen und -Häuten auf Vasopressin

In orientierenden Versuchen erwiesen sich isolierte Membranen von *Bufo bufo* weder auf Vasopressin (200 mU/ml) noch auf Oxytocin (100 mU/ml) empfindlich. Alle weiteren Versuche wurden deshalb an Membranen von *Bufo marinus* durchgeführt, die wie in Abb.8 dargestellt ist, auf Vasopressin deutlich reagieren. Unmittelbar nach Verabreichung des Hormones durch Wechseln der serosalen Badeflüssigkeit wurde ein Anstieg der transepithelialen Potentialdifferenz registriert, dem eine Zunahme der hydraulischen Leitfähigkeit entsprach. (Tab.3)

Präinkubation isolierter Membranen von *Bufo marinus* zur Auswaschung von Corticosteroiden

Durch Untersuchungen von Porter and Edelman (1964), Sharp and Leaf (1964) und Bentley (1968) ist bekannt, daß isolierte Membranen durch Präinkubation in steroidfreier Ringerlösung an endogenen Steroiden verarmen und gegenüber exogenen Steroiden sensibilisiert werden. Wie im methodischen Teil beschrieben, verwandten wir eine 12-stündige Präinkubationsphase, um den endogenen Steroidgehalt herabzusetzen. Die Effektivität dieses Vorgehens wurde im Prinzip nach Edelman et al.(1963) getestet. In der Abb.9 ist die Auswaschrates von ^3H -Cortisol in Abhängigkeit von der Auswaschzeit aufgetragen. Wie Edelman et al.(1963) für ^3H -Aldosteron beobachteten auch wir für ^3H -Cortisol unmittelbar nach Inkubation der isolierten Membranen in steroidfreier Ringerlösung eine rasche Abnahme der Radioaktivität. Sechs

Datum	Kontrolle [pl/F · h]	maximale Steigerung in der exp. Phase [pl/F · h]	Δ %
nicht präincubierte Häute			
5.11.70 a	20	36	+ 80
5.11.70 b	15	34	+ 124
17.02.71	9	17	+ 89
> 10 h präincubierte Häute			
10.11.70 a	39	100	+ 156
10.11.70 b	12	18	+ 50
12.11.70 a	27	56	+ 106
12.11.70 b *)	20	74	+ 269

*) siehe auch Abbildung 7

Tab. 2 ADH-Effekt auf die LP von Froschhäuten (Lieferung 1970)

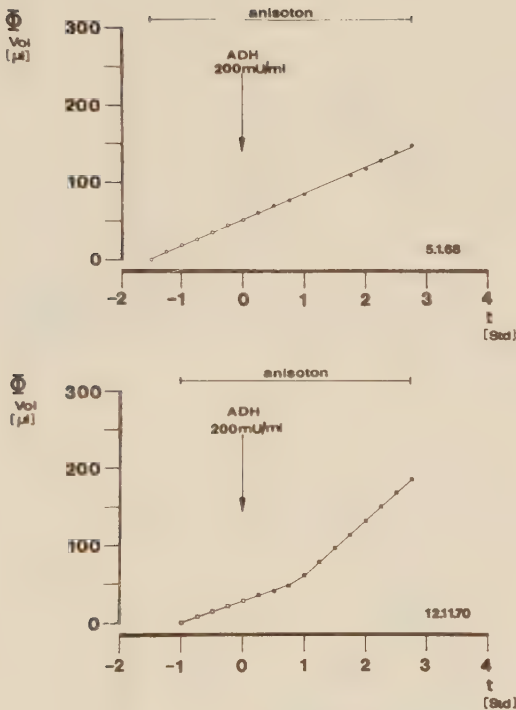


Abb. 7

Zeitlicher Verlauf des osmotischen Wasserflusses Φ (in μl) nach Vaso-
pressingabe (200 mU/ml) an zwei Einzelexperimenten mit Froschhäuten
verschiedenen Lieferungsdatums. Offene Symbole geben die Punkte vor
ADH-Gabe, geschlossene die nach ADH-Gabe an. Der osmotische Was-
serfluß (Vol/Zeit) ergibt sich hier aus der Steigung des kumulativ auf-
getragenen Wasserflusses. Obere Darstellung: Froschhaut der Lieferung
von 1968. Experiment vom 5.1.68. Keine Änderung der Steigung nach
ADH-Gabe, somit keine Änderung der hydraulischen Leitfähigkeit durch
ADH. Untere Darstellung: Froschhaut der Lieferung von 1970. Experiment
am 12.11.70. Nach ADH-Gabe steigt der kumulativ aufgetragene Wasser-
fluß an. Die hydraulische Leitfähigkeit wurde hier durch ADH erhöht.

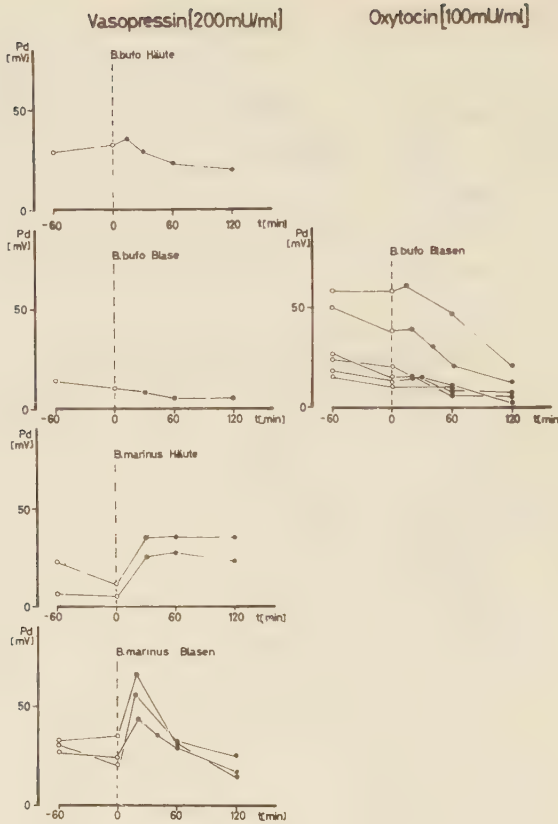


Abb. 8

Orientierende Versuche an isolierten Membranen von *Bufo bufo* und *Bufo marinus*. Gezeigt ist der zeitliche Verlauf der transepithelialen Potentialdifferenz (in mV) nach Gabe von Vasopressin 200 (mU/ml und Oxytocin (100 mU/ml) zum Zeitpunkt 0.

Offene Symbole stellen die Werte vor Hormongabe, geschlossene die nach Hormongabe dar. Wie ein Vergleich der Daten ergibt, zeigen lediglich die Membranen von *Bufo marinus* eine Reaktion auf Vasopressin.

Datum	Kontrolle [ul/F · h]	maximale Steigerung in der exp. Phase [ul/F · h]	Δ %
<u>nicht präincubierte Bauchhaut</u>			
25.07.68	80	262	+ 227
<u>> 10 h präincubierte Blasen</u>			
25.07.68	40	286	+ 615
15.12.70	52	200	+ 284
<u>nicht präincubierte Blase</u>			
3.03.71	45	480	+ 967

Tab. 3 ADH-Effekt auf die Lp von Bufo marinus Bauchhaut
und Blasen.

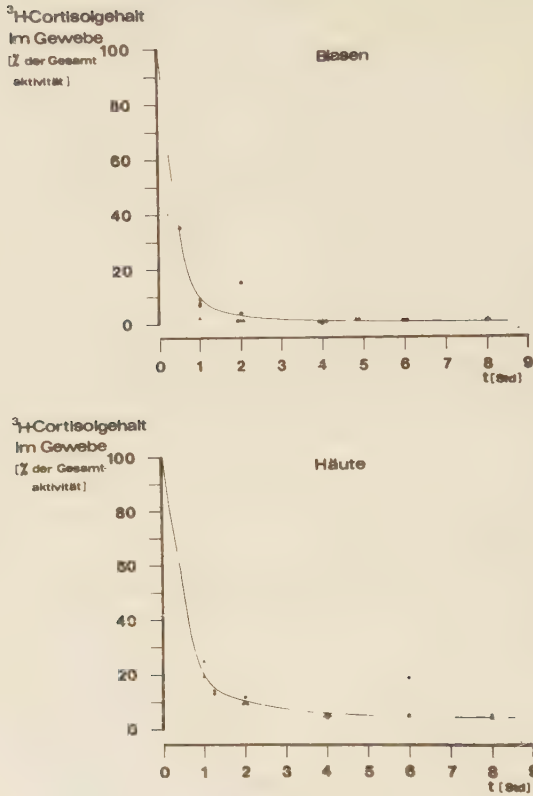


Abb. 9

Auswaschung von ^3H -Cortisol aus Membranen von *Bufo marinus*.
Die Ordinate gibt den ^3H -Cortisolgehalt (in % der Gesamtaktivität)
im Membrangewebe als Funktion der Zeit nach Inkubation in **stero-**
idfreiem Medium an.

▲ Versuch vom 21.5.1969

● Versuch vom 2.7.1969

Stunden nach Beginn der Präinkubation befanden sich in den Häuten nur noch ca. 5 %, in den Blasen weniger als 1 % der initialen Aktivität. Geht man davon aus, daß sich die endogenen Corticosteroide so verhalten wie ^3H -Aldosteron und ^3H -Cortisol, so kann man die über 10 Std. präinkubierten Membranen als weitgehend steroidverarmt ansehen.

D) Wirkung von Corticosteroiden auf die hydraulische Leitfähigkeit von isolierten Membranen (Bufo marinus).

a) Kontrollphase

Unmittelbar nach der Präinkubation wurden die isolierten Membranen in die Kammer eingespannt und der osmotische Wasserfluß von mucosal nach serosal während einer ein- bis zweistündigen Kontrollphase gemessen. Die osmotische Konzentrationsdifferenz zwischen beiden Kammern betrug dabei 225 mosmol/kg. Ein typischer Doppelversuch mit zwei Halbblasen ist in Abb.10 dargestellt. Trägt man den Wasserfluß kumulativ auf, so ist die Steigung der erhaltenen Kurven ein Maß für die hydraulische Leitfähigkeit.

In der Tab.4 sind die Wasserflüsse aus gepaarten Versuchen miteinander verglichen. Der aus allen an gepaarten Membranen berechnete mittlere transepitheliale Wasserfluß betrug in 34 Doppelexperimenten an 67 Halbblasen $34,14 \pm 2,50 \mu\text{l} \cdot 3,14 \text{ cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ (eine Halbblase war perforiert und konnte nicht verwendet werden). Dies entspricht einer hydraulischen Leitfähigkeit von $L_p = 5,79 \cdot 10^{-10} \text{ ml} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1} \cdot (\text{cm H}_2\text{O})^{-1}$.

Bei 17 Bauchhäuten der gleichen Tiere betrug der mittlere Wasserfluß in 34 Experimenten $76,35 \pm 5,04 \mu\text{l} \cdot 3,14 \text{ cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-2}$ (je ein Experiment an einer Hauthälfte). Daraus errechnet sich eine hydraulische Leitfähigkeit von $L_p = 12,95 \cdot 10^{-10} \text{ ml} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1} \cdot (\text{cm H}_2\text{O})^{-1}$. Die maximale Abweichung betrug bei Blasen 82,5 % und bei Häuten 60 %. Im Mittel unterschieden sich die Blasen um 24 % und die Häute um 16 %.

Bei beiden Gruppen streuten die transepithelialen Potentialdifferenzen zwischen 5 und 90 mV.

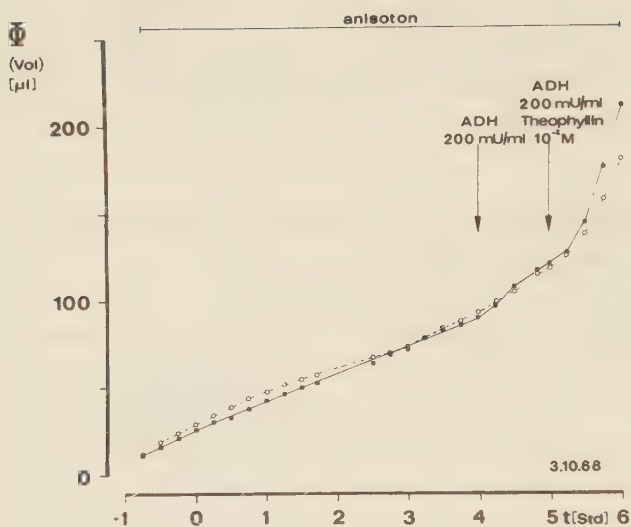


Abb. 10

Zeitlicher Verlauf des osmotischen Wasserflusses Φ (in μl) an der Krötenblase von *Bufo marinus* mit anisotoner Inkubation. Der osmotische Wasserfluß (Vol/Zeit) ergibt sich hier, wie in Abb. 7 dargestellt, aus der Steigung des kumulativ aufgetragenen Wasserflusses. Die offenen Symbole stellen die Punkte der Kontrollblasenhälfte, die geschlossenen Symbole die der experimentellen Blasen Hälfte desselben Tieres dar. Zur Zeit Null wurde Cortisol zur experimentellen Membran in die serosale Kammer gespritzt (10^{-5} M), während zur Kontrollmembran nur das Lösungsmittel zugegeben wurde. An beiden Membranen änderte sich die hydraulische Leitfähigkeit nicht. Vier bzw. fünf Stunden danach erhielten beide Membranen Vasopressin bzw. Vasopressin mit Theophyllin (10^{-2} M). Danach stieg die hydraulische Leitfähigkeit von beiden Membranen deutlich an.

Datum	Blasen		Häute	
	I [µl/F · h]	II [µl/F · h]	I [µl/F · h]	II [µl/F · h]
		Δ %		Δ %
25.07.68	40.0	+ 82.5	80.0	70.0
16.09.68	58.0		70.0	90.0
17.09.68	15.0	+ 60.0	-	-
18.09.68 a	28.0	+ 7.1	-	-
18.09.68 b	104.0	+ 49.0	-	-
21.09.68	26.0	+ 7.7	-	-
23.09.68	36.0	+ 11.1	-	-
24.09.68	38.0	+ 39.5	-	-
26.09.68	30.0	- 26.6	-	-
27.09.68	44.0	- 27.3	-	-
3.10.68	21.0	+ 0	56.0	72.0
4.10.68	35.0	- 28.6	152.0	146.0
7.10.68	20.0	- 10.0	-	-
9.10.68	24.0	+ 7.7	76.0	78.0
11.10.68	22.0	+ 0	100.0	148.0
15.10.68	44.0	+ 4.5	76.0	84.0
1.11.68	32.0	- 25.0	64.0	64.0

Tab. 4 (1. Teil) Lp der Kontrollphasen an gepaarten Membranen (I und II) von Bufo marinus.

Datum	Blasen		Häute	
	I	II	I	II
	[$\mu\text{l}/\text{F} \cdot \text{h}$]	[$\mu\text{l}/\text{F} \cdot \text{h}$]	[$\mu\text{l}/\text{F} \cdot \text{h}$]	[$\mu\text{l}/\text{F} \cdot \text{h}$]
	Δ	Δ	Δ	Δ
	%	%	%	%
22.11.68	23.0	25.0	96.0	100.0
29.11.68	24.0	22.0	72.0	80.0
3.01.69	24.0	36.0	36.0	42.0
25.02.69	35.0	30.0	56.0	74.0
27.02.69	38.0	50.0	50.0	80.0
3.03.69	20.0	25.0	40.0	40.0
5.03.69	26.0	22.0	72.0	92.0
11.03.69	36.0	36.0	36.0	36.0
28.03.69	20.0	25.0	-	-
15.07.69	18.0	26.0	-	-
17.07.69	16.0	28.0	-	-
18.07.69	29.0	25.0	-	-
22.07.69	36.0	30.0	-	-
14.09.69	27.0	24.0	-	-
24.09.69	32.0	44.0	-	-
15.12.70	44.0	52.0	-	-
3.03.71	45.0	30.0	84.0	84.0
				± 0

$\bar{x}$	= 32.64	$\bar{x}$	= 35.42	$\bar{x}$	= 24.69	$\bar{x}$	= 71.53	$\bar{x}$	= 81.18	$\bar{x}$	= 16.00
S.E.	= 2.74	S.E.	= 4.45	S.E.	= 3.63	S.E.	= 6.83	S.E.	= 7.44	S.E.	= 4.32
n	= 34	n	= 33	n	= 33	n	= 17	n	= 17	n	= 17
											max. = 60.0

Tab. 4 (2. Teil) Lp der Kontrollphasen an gepaarten Membranen (I und II) von Bufo marinus.

b) Verabreichung von Corticosteroiden zur Inkubationsflüssigkeit

Nach Abschluß der Kontrollphase wurde das zu untersuchende Corticosteroid der Inkubationsflüssigkeit zugesetzt. Dabei wurden vier verschiedene Versuchsprotokolle durchgeführt:

1) Anisotone Inkubation

Hier wurde das gelöste Corticosteroid in die serosale Inkubationsflüssigkeit der einen Halbbhase (bzw. Hauthälfte) gespritzt, während im Parallelexperiment nur das Lösungsmittel serosal verabreicht wurde. Ein osmotischer Gradient blieb also während der gesamten Einwirkungszeit des Steroids bestehen.

Dieses Vorgehen wurde bei insgesamt 10 Halbbhasen und 4 Häuten angewandt. Dabei verwendeten wir, wie in Tab. 5 gezeigt, Cortisol in einer Dosierung von 10^{-4} M und 10^{-5} M und Dexamethason in einer Dosierung von 10^{-8} M und 10^{-5} M. Am Ende dieser experimentellen Phase, die über 2 bis 4 Stunden ausgedehnt wurde, verabreichten wir serosal Vasopressin (200 mU/ml), um die Ansprechbarkeit der jeweiligen Membranen zu testen. Diese Nachphase erstreckte sich über ca. 1 Std. Diese Zeit ist zum Nachweis des ADH-Effektes ausreichend. In einigen Versuchen wurde außerdem nachträglich Theophyllin (10^{-2} M) der ADH-haltigen Badeflüssigkeit zugesetzt.

Ein typischer Versuch ist in Abb.10 dargestellt. Aus der Steigung der Kurven ist ersichtlich, daß Cortisol in dem gezeigten Versuch die Wasserpermeabilität der Halbbhase nicht meßbar beeinflusste.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in der Tab.5 dargestellt. Der osmotische Wasserfluß änderte sich in 14 Versuchen nicht deutlich nach Zugabe der verwandten Steroide, obwohl alle Häute und Blasen auf ADH bzw. auf ADH + Theophyllin den erwarteten Effekt zeigten.

B i a s e n									
I Kontrollmembran					II exp. Membran				
Datum	Kontrollphase [µl/F · h]	Exp. Phase (ohne Steroid) [µl/F · h]	Δ %	ADH [µl/F · h]	ADH + Theo. [µl/F · h]	Kontrollphase [µl/F · h]	Exp. Phase (mit Steroid) [µl/F · h]	Δ %	ADH + Theo. [µl/F · h]
				max.				max.	max.
Cortisol 10 ⁻⁴ M									
23.09.68	36.0	-	-	-	312	40.0	40.0	+	0
Cortisol 10 ⁻⁵ M									
16.09.68	26.0	30.0	undicht	-	430	58.0	54.0	-	8.9
21.09.68	21.0	17.0	+ 15.4	-	39	28.0	34.0	-	28.6
3.10.68	21.0	17.0	- 19.0	30	39	21.0	17.0	-	19.0
Dexamethason 10 ⁻⁵									
25.07.68	40	-	-	-	286	73.0	73.0	±	0
17.09.68	-	-	-	-	-	24.0	24.0	±	0
18.09.68	-	-	-	-	-	104.0	120.0	+	15.4
18.09.68	-	-	-	-	-	155.0	148.0	-	4.5
4.10.68	35.0	31.0	- 11.4	36	101	25.0	27.0	+	8.0
Dexamethason 10 ⁻⁸ M									
17.09.68	-	-	-	-	-	15.0	15.0	±	0
Cortisol 10 ⁻⁵ M									
16.09.68	70.0	-	-	146	-	90.0	74.0	-	17.8
3.10.68	56.0	58	-	60	116	72.0	58.0	-	36.1
Dexamethason 10 ⁻⁵ M									
25.07.68	80.0	-	-	262	-	70.0	80	+	14.2
4.10.68	152.0	120	- 21.0	120	197	146.0	150	+	2.7

Übersicht über die bei anisotomer Inkubation an gepaarten Membranen von
Bufo marinus erhaltenen Werte. I = Kontrollmembran II = experimentelle Membran.
Die Versuche sind im Text besprochen.

Tab. 5

2) Isotone Inkubation

Die zweite Art der Corticosteroidapplikation bestand darin, daß nach der Kontrollphase auf der mucosalen Seite isotone Frosch-ringerlösung eingefüllt wurde. Das zu untersuchende Nebennieren-rindenhormon wurde beiden Badeflüssigkeiten zugesetzt. Dieses Vorgehen unterschied sich demnach von dem unter 1) genannten dadurch, daß während einer mindestens einstündigen isotonen Inku-bationsphase kein osmotischer Gradient und damit kein osmotischer Wasserfluß bestand. Die Hormone, von denen bekannt ist, daß sie vorwiegend von der serosalen Seite aus einwirken, wurden somit bei der Diffusion an die Rezeptoren in den Membranen nicht durch einen entgegengesetzt gerichteten osmotischen Wasserfluß behindert. Nach der isotonen Inkubationsphase wurde in der mucosalen Kam-mer die isotone Ringerlösung wieder durch 1 : 10 verdünnte Ringer-lösung ersetzt, die jedoch die gleiche Steroidkonzentration besaß. Wie aus der Tab.6 hervorgeht, wurden Cortisol (10^{-5} M), Dexa-methason (10^{-5} M) und Corticosteron (10^{-5} M) geprüft. Eine reprä-sentatives Experiment ist in der Abb.11 wiedergegeben. Auch hier wurde am Ende der experimentellen Phase eine Nachphase mit ADH angeschlossen. Während der isotonen Phase wurde der transepithe-liale aktive Natriumtransport, wie von Ussing (1951) und Leaf et al. (1958) angegeben als Kurzschlußstrom gemessen.

Bei den 16 durchgeführten Versuchen fand sich trotz der isotonen Inkubation keine steroidbedingte systematische Änderung der hydrau-lischen Leitfähigkeit.

3) Isotone Inkubation mit gleichzeitiger Theophyllinstimulierung

Bei allen bis dahin durchgeführten Versuchen an Fröschen und Kröten konnte Theophyllin den Vasopressineffekt verstärken. Des-halb wurde in einer weiteren Versuchsserie während der isotonen Inkubationsphase mit Corticosteroiden beiden Badeflüssigkeiten Theophyllin in einer Konzentration von 10^{-2} M zugesetzt. Das

Blasen

I Kontrollmembran					II Exp. Membran					
Datum	Kontrollphase [$\mu\text{l/F} \cdot \text{h}$]	Exp. Phase (ohne Steroid) [$\mu\text{l/F} \cdot \text{h}$]	Δ %	ADH [$\mu\text{l/F} \cdot \text{h}$] max	ADH+Theo [$\mu\text{l/F} \cdot \text{h}$] max	Kontrollphase (mit Steroid) [$\mu\text{l/F} \cdot \text{h}$]	Exp. Phase (mit Steroid) [$\mu\text{l/F} \cdot \text{h}$]	Δ %	ADH [$\mu\text{l/F} \cdot \text{h}$] max	ADH + Theo [$\mu\text{l/F} \cdot \text{h}$] max
Cortisol 10^{-5} M										
09.10.68	18	25	+ 38.9	168	286	26	26	0	40	153
11.10.68	22	22	$\pm$ 0	20	140	22	26	+ 18.2	108	232
22.11.68	25	12	- 52.0	120	-	23	16	- 30.4	196	-
3.01.69	24	20	- 16.7	265	-	36	33	- 8.3	270	-
Dexamethason 10^{-5} M										
5.03.69	26	22	- 15.4	139	-	22	30	+ 36.4	200	-
11.03.69	36	40	+ 11.1	264	-	36	38	+ 5.5	288	-
15.07.69	18	14	- 22.2	171	-	26	16	- 38.5	277	-
17.07.69	16	16	$\pm$ 0	280	-	28	24	- 14.3	120	-
Corticosteron 10^{-5} M										
27.02.69	38	37	- 2.6	172	-	50	60	+ 20.0	144	-
3.03.69	20	24	+ 16.7	200	-	25	35	+ 40.0	200	-
Häute										
Cortisol 10^{-5} M										
9.10.68	76	60	- 21.1	60	60	72	62	- 13.8	62	72
11.10.68	100	102	+ 2.0	100	220	148	97	- 34.5	92	116
22.11.68	96	70	- 27.1	-	160	100	50	- 50.0	-	120
3.01.69	36	32	- 11.1	30	112	42	30	- 28.6	50	80
Dexamethason 10^{-5} M										
5.03.69	72	36	- 50.0	-	-	92	56	- 39.1	-	-
11.03.69	36	50	+ 38.9	72	-	36	60	+ 66.7	72	-

Tab. 6 Übersicht über die bei isotoner Inkubation an gepaarten Membranen von Bufo marinus erhaltenen Werte. I = Kontrollmembran II = experimentelle Membran. Die Versuche sind im Text besprochen.

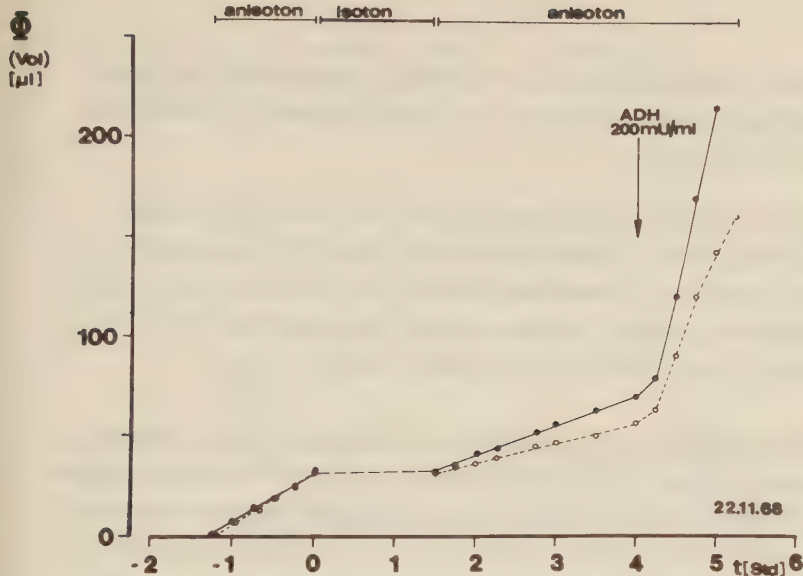


Abb. 11

Zeitlicher Verlauf des kumulativ aufgetragenen osmotischen Wasserflusses Φ (in μl) an der Krötenblase von *Bufo marinus* mit isotoner Inkubation. Offene Symbole = Punkte der Kontrollmembran, geschlossene Symbole = Punkte der experimentellen Membran desselben Tieres. Zur Zeit Null wurde auf der mukosalen Seite beider Membranen isotone Froschringerlösung eingefüllt. Der experimentellen Membran wurde gleichzeitig mukosal und serosal Cortisol (10^{-5} M) zugesetzt, während der Kontrollmembran nur das Lösungsmittel zugegeben wurde. Nach 90-minütiger isotoner Inkubation wurde in der mukosalen Kammer die isotone Ringerlösung wieder durch 1 : 10 verdünnte Ringerlösung ersetzt, die jedoch die gleiche Steroidkonzentration bzw. einen äquivalenten Lösungsmittelanteil besaß. Vier Stunden nach Steroidgabe wurde Vasopressin (200 mU/ml) serosal zugegeben. Der osmotische Wasserfluß während der isotonen Inkubationsphase wurde in diesem Versuch nicht gemessen (unterbrochene Linie). Der durch den Na-Transport bedingte Wasserfluß bei fehlenden osmotischen Gradienten ist klein und kann vernachlässigt werden (Veceli et al. (1966) und Hays & Leaf (1962), eigene Messungen).

weitere Vorgehen entsprach dem unter 2) angegebenen. Auch hier wurde am Ende des Versuchs die Ansprechbarkeit der Membranen auf ADH getestet.

Einen typischen Versuch zeigt die Abb. 12. Die Tab.7 enthält alle nach diesem Vorgehen gewonnenen Werte. Die einzelnen Versuche weisen eine erhebliche Streuung der Daten auf. Ein direkter Einfluß von Cortisol, welches in einer Konzentration von 10^{-5} M getestet wurde, konnte nicht gesichert werden.

4) Isotone Inkubation nach Stimulation der Membran durch Aldosteron

In der Literatur existieren Hinweise darauf, daß Mineralocorticoide und Glucocorticoide zusammen eine größere Wirksamkeit entfalten als ein Corticoid allein (Murayama et al. 1968). Deshalb prüften wir, ob die hier geprüften Glucocorticoide Dexamethason und Cortisol in Kombination mit Aldosteron einen direkten Effekt auf die hydraulische Leitfähigkeit ausüben würden.

Zunächst wurde in 4 Versuchen die Wirkung von Aldosteron allein verfolgt. Das Mineralocorticoid wurde während einer zweistündigen Inkubationsphase in einer Konzentration von 10^{-7} M der serosalen Badeflüssigkeit zugesetzt. Während dieser Zeit wurde wieder der Kurzschlußstrom registriert. Daran anschließend wurde wie unter 2) beschrieben der osmotische Wasserfluß gemessen und schließlich die Ansprechbarkeit auf Vasopressin getestet. Wie aus den in Tab.8 zusammengefaßten Daten hervorgeht, hatte Aldosteron in der verwandten Dosierung keinen Einfluß auf die Wasserpermeabilität. Der Kurzschlußstrom lag mit der für die Aldosteroneinwirkung typischen Latenzzeit (Abb.13) in allen Experimenten an.

In 7 weiteren Versuchen wurden 3 Std. nach der Verabreichung von Aldosteron während einer erneuten isotonen Inkubationsphase Dexamethason (10^{-5} M) oder Cortisol (10^{-5} M) zugesetzt und danach

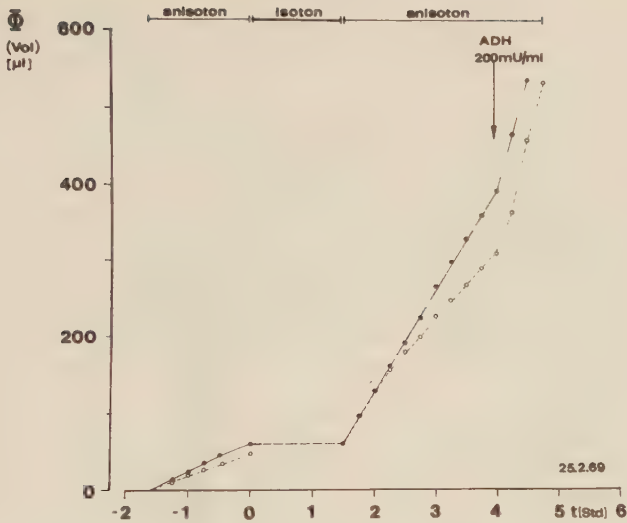


Abb. 12

Zeitlicher Verlauf des kumulativ aufgetragenen osmotischen Wasserflusses Φ (in μl) an der Krötenblase von *Bufo marinus* mit isotoner Inkubation und gleichzeitiger Theophyllinstimulierung.

Offene Symbole = Kontrollmembran, geschlossene Symbole = experimentelle Membran.

Zur Zeit Null wurde während der isotonen Inkubationsphase beiden Badeflüssigkeiten Theophyllin (10^{-2} M) zugesetzt, sowohl der Kontrollmembran als auch der experimentellen. Das weitere Vorgehen entsprach dem von Abb. 11. Als Corticoid wurde Cortisol (10^{-5} M) verabreicht.

Auch hier wurde vier Stunden nach Corticoid- und Theophyllingabe beiden Membranen Vasopressin (200 mU/ml) zugegeben.

Die hydraulische Leitfähigkeit beider Membranen war in der experimentellen Phase gestiegen (größere Steigung des kumulativ aufgetragenen Wasserflusses Φ). Die mit Cortisol behandelte Membran unterschied sich dabei nicht wesentlich von der Kontrollmembran. ADH-Gabe nach vier Stunden bewirkte an beiden Membranen eine weitere Steigerung der hydraulischen Leitfähigkeit.

Blasen						
I Kontrollmembran				II exp. Membran		
Datum	Kontrollphase [$\mu\text{l/F} \cdot \text{h}$]	Exp. Phase (ohne Steroid) [$\mu\text{l/F} \cdot \text{h}$]	Δ %	ADH [$\mu\text{l/F} \cdot \text{h}$]	Kontrollphase [$\mu\text{l/F} \cdot \text{h}$]	Exp. Phase (mit Steroid) [$\mu\text{l/F} \cdot \text{h}$]
						Δ %
Cortisol 10^{-5} M						
15.10.68	44	93	+ 111.4	484	46	80
1.11.68	32	150	+ 368.8	236	24	110
29.11.68	24	40	+ 66.7	364	22	80
25.02.69	35	90	+ 157.1	380	30	126
Cortisol 10^{-5} M						
15.10.68	76	160	+ 110.5	240	84	145
1.11.68	64	160	+ 150.0	200	64	115
29.11.68	72	148	+ 105.5	172	80	124
25.02.69	56	160	+ 185.7	162	74	128
II Saute						
						Δ %
						73.9
						358
						72.5
						320.0
						476
						188
						300
						300
						224
						128
						152
						86.5
						100

Tab. 7
Übersicht über die bei isotoner Inkubation mit Theophyllin an gepaarten Membranen von *Bufo marinus* erhaltenen Werte. I = Kontrollmembran II = experimentelle Membran.
Die Versuche sind im Text besprochen.

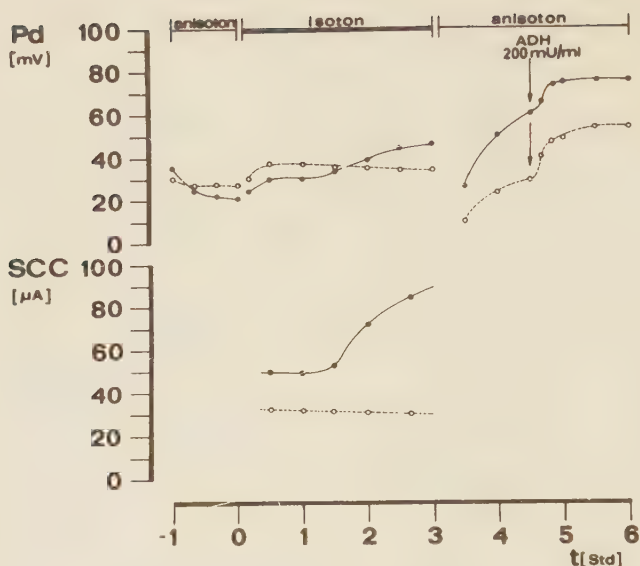


Abb. 13

Einfluß von Aldosteron (10^{-7} M) auf den zeitlichen Verlauf der transepithelialen Potentialdifferenz in mV (obere Kurven) und den Kurzschlußstrom in μ A (untere Kurven) der Krötenblase von *Bufo marinus*.

Offene Symbole = Kontrollmembran, geschlossene = mit Aldosteron behandelte Membran. Zur Zeit Null wurden beide Membranen *isoton* inkubiert; lediglich die experimentelle Membran (—●—) erhielt Aldosteron, die Kontrollmembran nur das Lösungsmittel.

Nach deutlichem Anstieg der Potentialdifferenz und des Kurzschlußstromes in der Aldosteron behandelten Membran wurde nach 3 Std. mukosal wieder 1 : 10 verdünnter Ringer eingefüllt und daraufhin der osmotische Wasserfluß gemessen. Kurzschlußstrommessungen wurden nur während der *isotonen* Phase durchgeführt, da sie nur dann mit dem aktiven Natriumtransport der Membran korreliert werden können (24.9.69).

der osmotische Wasserfluß gemessen. Die zweite isotone Inkubationsphase dauerte eine Stunde. Am Ende schloß sich wiederum eine Vasopressinnachphase an. Ein typisches Experiment ist in Abb.14 dargestellt.

Die Tab. 8 enthält die Einzeldaten aller Experimente dieser Versuchsreihe. Ein sicherer Einfluß der Steroidkombination auf die hydraulische Leitfähigkeit konnte auch unter diesen experimentellen Bedingungen nicht nachgewiesen werden.

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit haben wir den osmotischen Wasserfluß durch isolierte Membranen von *Bufo marinus* unter dem Einfluß von verschiedenen NNR-Hormonen untersucht. Eine direkte Wirkung konnte an Bauchhäuten und Urinblasen weder durch Cortisol oder Dexamethason noch durch die Kombination beider Hormone mit Aldosteron nachgewiesen werden. Cortisol und Dexamethason normalisierten jedoch die bei Säugetieren in der NNR-Insuffizienz auftretende Hemmung der Wasserausscheidungskapazität.

In der Literatur finden sich verschiedene Ergebnisse, die mit unseren Befunden verglichen werden müssen. So zeigten Green et al. (1970), daß adrenaletomierte Ratten mit hereditärem Diabetes insipidus ebenfalls eine Hemmung der Wasserausscheidungsfähigkeit aufweisen, die durch NNR-Hormone aufgehoben werden kann. Dieser Befund spricht für eine direkte Wirkung von Corticosteroiden auf die Wasserpermeabilität - zumindest bei Ratten. Dem scheinen Befunde von Marumo (1968) zu entsprechen; dieser Autor untersuchte den Effekt von Glucocorticoiden auf die Wasserpermeabilität der Urinblase von *Bufo bufo japonicus* und fand im Gegensatz zu unseren Ergebnissen unter dem Einfluß von Cortisol (10 γ /ml) eine Abnahme der osmotischen und der

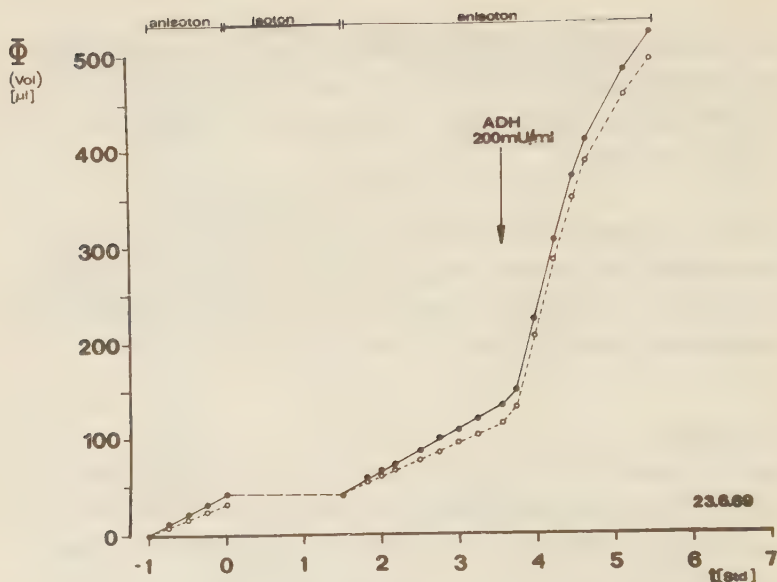


Abb. 14

Zeitlicher Verlauf des kumulativ aufgetragenen osmotischen Wasserflusses nach Cortisol (10^{-5} M) an der Krötenblase von *Bufo marinus*, mit isotoner Inkubation und vorheriger Aldosteronstimulierung.

Offene Symbole = Kontrollmembran

Geschlossene Symbole = Experimentelle Membran.

Vier Stunden vor Cortisolgabe, das zur Zeit 0 mit einer isotonen Inkubation appliziert wurde, wurden die Urinblasen durch Aldosteron (10^{-7} M) stimuliert. Außerdem wurden die Blasen vor der Cortisolgabe noch einer einstündigen anisotonen Phase ausgesetzt, um die Kontrollpermeabilität zu ermitteln. Am Ende der experimentellen Phase wurde Vasopressin (200 mU/ml) zugegeben (s. Pfeil). Es zeigt sich kein Unterschied der hydraulischen Leitfähigkeit der mit Aldosteron und Cortisol behandelten Membran zur Kontrollmembran, die nur mit Aldosteron behandelt war. Eine starke Erhöhung der hydraulischen Leitfähigkeit nach ADH ist an der zunehmenden Steigung des kumulativ aufgetragenen Wasserflusses zu sehen.

Diffusions-Permeabilität für Wasser um ca. 35 %. Dabei ist zu beachten, daß bei den genannten Untersuchungen die mit der Methode nach de Moor et al. (1960) bestimmte Gewebskonzentration von 11-OHCS durch Präinkubation nur auf 42 % des endogenen Kontrollwertes vermindert war. Eine Wiederholung der Versuche an *Bufo marinus* ergab jedoch - wie bei uns - keine direkte Steroidwirkung auf die Permeabilität (Marumo, persönliche Mitteilung). Mit isolierten Amphibienmembranen arbeiteten auch Crabbé (1963b) und Handler et al. (1969). Crabbé untersuchte Aldosteron (10^{-5} M), Cortisol ($2,5 \times 10^{-4}$ M) und Corticosteron ($2,5 \times 10^{-4}$ M) an der Urinblase von *Bufo marinus* und fand weder einen Effekt auf die Diffusion von THO noch auf die osmotische Permeabilität in Anwesenheit einer osmotischen Konzentrationsdifferenz von 180 mosmol/kg. Die Hormone wurden nur auf der serosalen Seite verabreicht. Der in der Arbeit ebenfalls untersuchte ADH-Effekt (keine Dosisangabe) wurde durch die geprüften Steroide nicht beeinflusst. Crabbé schloß daraus, daß der osmotisch induzierte Wassertransport in der Krötenblase im Gegensatz zur Niere nicht durch Corticosteroide gesteuert wird. Einschränkend ist hier zu bemerken, daß die Häute nicht durch eine Präinkubation steroidverarmt waren.

Mit der Methode von Bentley (1958) untersuchten Handler et al. (1969) ebenfalls bei *Bufo marinus* die Diffusions- und Filtrationspermeabilität unter dem Einfluß von Corticosteroiden; Allerdings konzentrierten sich diese Autoren auf eine Analyse des Steroideffektes auf die Vasopressinstimulation der Wasserpermeabilität. Zunächst konnte gezeigt werden, daß Aldosteron (2×10^{-9} bis 2×10^{-7} M) und Dexamethason (2×10^{-9} bis 2×10^{-8} M) die ADH-Wirkung (Pitressin 25-30 mU/ml) auf den osmotischen Wasserfluß im Vergleich zu steroidverarmten Membranen verstärkte. Der Aldosteronantagonist Spirolacton (SC-14266) hemmte zwar den mineralcorticoiden Effekt des "Glucocorticoids" Dexamethason, hatte jedoch kaum einen Einfluß auf die ADH-verstärkende Wirkung des synthetischen Corticoids. Die von Handler et al. (1969) mitgeteilten Befunde unter-

scheiden sich sowohl die Wasserpermeabilität als auch die Harnstoffpermeabilität betreffend von Marumos Daten. Sie widersprechen auch den Befunden von Crabbé(1963), der wie oben dargestellt, keine Beeinflussung des ADH-Effektes durch Steroide beobachtet hatte.

Zur Erklärung der unterschiedlichen Ergebnisse sind neben Speciesunterschieden (Marumo (1968), Handler et al. (1969)) vor allem Unterschiede im methodischen Vorgehen zu nennen: bei Crabbé wurden die Membranen im Gegensatz zu Marumo (1968), Handler et al. (1969) und uns nicht präinkubiert und hatten deshalb eine nicht überschaubare endogene Gewebskonzentration von Steroiden. Handler et al. (1969) benutzten ein unterschiedliches zeitliches Vorgehen, indem sie die Kontrollblasen 18 Std. zur Steroidverarmung präinkubierten, die experimentellen Membranen jedoch während der ganzen Präinkubationszeit dem zu prüfenden Hormon aussetzten, oder aber, in anderen Experimenten, das Steroidhormon nach einer 18-stündigen Präinkubation mindestens 6 Std. einwirken ließen.

Abschließend ist festzustellen, daß mit Ausnahme von Urinblasen der Species *Bufo bufo japonicus* (Marumo 1968) keine der bisher untersuchten isolierten Membranen eine Hemmung der osmotischen Wasserpermeabilität nach Steroideinwirkung aufwies.

Damit erhebt sich erneut die Frage, ob die an der Niere nach Ausfall der NNR-Funktion auftretende Hemmung der Wasserausscheidungskapazität direkt durch das Fehlen von Glucocorticoiden bedingt ist (Stolte et al. 1968) oder aber das ADH-System hier zwischengeschaltet ist wie verschiedene Autoren vermuten (Ahmed et al.(1967) Dingman and Despointes (1960), Gaunt and Chart (1962), Peters (1960). Die bereits zitierte Arbeit von Green et al. (1970) ist ein starkes Argument für die erstere Hypothese.

Im Folgenden soll deshalb erörtert werden, warum in den vorliegenden Versuchen an Amphibienmembranen der an der Säugetieriere postulierte Effekt nicht nachgewiesen werden konnte. Dies konnte bedingt sein durch:

- 1) eine ungeeignete Versuchsanordnung
- 2) durch geschädigte Membranen
- 3) durch ungenügende Steroidverarmung der Membranen bzw. durch ungenügende Exposition der verarmten Membranen gegenüber den zu untersuchenden Steroiden,
- 4) durch Speciesunterschiede.

Zu 1) Die hier entwickelte Apparatur gestattete die volumetrische Messung des osmotisch induzierten Wasserflusses von mucosal nach serosal im geschlossenen System. Die Zufuhr und Abfuhr von Gasen wurde durch fein ausgezogene Polyäthylenschläuche gewährleistet, deren Wandpermeabilität für O_2 und CO_2 einen hinreichenden Gasaustausch ermöglichte. Wie in der Methodik ausgeführt, konnte in dieser Apparatur der Sauerstoffdruck und der pH-Wert der Badeflüssigkeiten während der Versuche konstant gehalten werden. Außerdem konnte durch das Doppelpipettensystem die Dichtigkeit der Apparatur in den Versuchen nachgewiesen werden. Die durch einen Magnetrührer bewerkstelligte Durchmischung der beiden Kammerflüssigkeiten erfolgte ebenfalls im geschlossenen System.

Durch mehrere Untersuchungen ist bekannt geworden, daß die Dehnung isolierter Membranen durch hydrostatische Druckdifferenzen zu Änderungen der Transportcharakteristik führt (Nutbourne (1968), Stackelberg (1969), Brouha et al. (1970), Gfeller u. Walser (1971)). Wir haben deshalb das Ausbuchten der Membranen in unseren Versuchen durch ein von einer durchlöchernten Plexiglasscheibe unterstütztes Nylonnetz verhindert, an das die jeweilige Membran durch eine hydrostatische Druckdifferenz von ca. 10 cm H_2O angelegt wurde. Um den Effekt von Randquetschungen der eingespannten Membranen auf die transmembranalen Flüsse möglichst gering zu halten, wurden

beide Kammern durch einen konstanten Federdruck zusammengehalten.

Diese Apparatur unterscheidet sich somit von den bisher gebräuchlichen Kammern. Entweder wurde im offenen System gearbeitet, was die Notwendigkeit des intermittierenden Absaugens von Flüssigkeit zur Messung des Volumenflusses mit sich bringt (Fuhrmann & Ussing (1951), Koefoed Johnson et al. (1952)) oder aber im geschlossenen System, wobei der Volumenfluß mit aufwendigerer Methodik gravimetrisch über eine Präzisionswaage Bentley (1961) und House (1964) ohne kontinuierliche Gaszufuhr (Vecli et al. 1966) gemessen wurde. Halboffene Kammertypen wie sie von Bourguet & Jard (1964) und von Edelman et al. (1964), Lichtenstein & Leaf (1965), House (1969) und Natochin et al. (1970) benutzt wurden, gestatten zwar die kontinuierliche Registrierung des Wasserflusses, jedoch nur auf einer Seite. Desgleichen kann hier die Begasung nur einseitig erfolgen.

Mit der für die vorliegenden Versuche entwickelten Kammer wurden Wasserflüsse durch die Membranen gemessen, die den in der Literatur mitgeteilten Daten entsprechen (Tab.9). Außerdem konnten mit der neuen Versuchsanordnung bei bestehenden osmotischen Gradienten eine lineare Steigung des kumulativen Volumenflusses registriert werden (vgl. Abb. 8, 10, 11, 12, 14), die bei isotoner Inkubation verschwand. Eine apparative Unzulänglichkeit kann u.E. nicht die Ursache des fehlenden Effektes sein.

Zu 2) Auch eine Schädigung der verwendeten Membranen scheidet als Ursache des fehlenden Steroideffektes auf die Wasserpermeabilität aus. Die Membranen wiesen alle transsepitheliale elektrische Potentialdifferenzen (mucosal negativ gegen serosal) und Kurzschlußstromdichten (in der bekannten Richtung) auf, die bei isotoner Inkubation im Bereich der in der Literatur mitgeteilten Werte lagen. Als weitere wichtige Funktionskriterien sind die Ansprechbarkeit der präinkubierten Membranen auf Vasopressin (200 mV/ml), Theophyllin (10^{-2} M)

Lp

Autor Originalangabe

$[\text{ml} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1} \cdot (\text{cm H}_2\text{O})^{-1}]$

Bentley 1961	13.4 μl pro halber Blase	$\cdot \text{h}^{-1} \cdot 125 \text{ mOsm}^{-1}$	-	*
Hays u. Leaf 1962	5 μl	$\cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1} \cdot 160 \text{ mOsm}^{-1}$	$3.72 \cdot 10^{-10}$	
Edelman et al. 1964	0.2 $\mu\text{l} \cdot 3.1 \text{ cm}^{-2}$	$\cdot \text{min}^{-1} \cdot 190 \text{ mOsm}^{-1}$	$2.43 \cdot 10^{-10}$	
	1.0 $\mu\text{l} \cdot 7.1 \text{ cm}^{-2}$	$\cdot \text{min}^{-1} \cdot 190 \text{ mOsm}^{-1}$	$5.31 \cdot 10^{-10}$	
Lichtenstein u. Leaf 1965	6 μl	$\cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1} \cdot 170 \text{ mOsm}^{-1}$	$4.21 \cdot 10^{-10}$	
Gulyassy u. Edelman 1965	1 $\mu\text{l} \cdot 7.1 \text{ cm}^{-2}$	$\cdot \text{min}^{-1} \cdot 190 \text{ mOsm}^{-1}$	$5.31 \cdot 10^{-10}$	
eigene Versuche s. Tab. 4	34.14 $\mu\text{l} \cdot 3.14 \text{ cm}^{-2}$	$\cdot \text{h}^{-1} \cdot 225 \text{ mOsm}^{-1}$	$5.79 \cdot 10^{-10}$	

45

*) keine Berechnung da keine genaue Flächenangabe

Tab. 9 Osmotische Wasserpermeabilität von unbehandelten Bufo marinus Blasen.

und Aldosteron (10^{-7} M) zu nennen. Der ADH-Effekt und der Aldosteroneffekt ist durch zahlreiche Experimente früherer Untersucher belegt (u.a. Steen (1929), Ewer (1952), Sawyer & Schisgall (1956), Bentley (1958), Leaf et al. (1958), Leaf (1960), Leaf & Demsey (1960), Bourguet & Maetz (1961), Crabbé (1961a) und (1961b), Porter & Edelman (1964), Sharp & Leaf (1964). Eine Wirkung von Theophyllin auf Amphibienmembranen wurde von Orloff et al. (1962) Cuthbert & Painter (1968) und Kristensen (1970) beschrieben, auch Parisi et al. (1969).

Zu 3) In den vorliegenden Versuchen wurden die zu prüfenden Membranen über 12 Stunden präinkubiert, um den endogenen Steroidgehalt möglichst stark zu senken. Orientierende Versuche mit einem ^3H -markierten, exogenen Cortisolpräparat ergaben, daß nach der verwandten Inkubationszeit bei Blasen und Häuten nur noch Spuren (5 %) des anfangs vorhandenen ^3H -markierten Steroidmenge im Gewebe verblieben war. Wie bereits ausgeführt, haben auch andere Untersucher die Wirksamkeit von Präinkubationen zur Senkung des endogenen und exogenen Steroidgehaltes geprüft und bestätigt gefunden (Edelman et al. (1963), Porter & Edelman (1964), Sharp & Leaf (1964), Marumo (1968) Bentley (1968), Handler et al. (1969). Marumo (1968) konnte bei *Bufo bufo japonicus* einen Steroideffekt nachweisen, obwohl die Membranen noch ca. 42 % der endogenen 11-OHCS enthielten. Wir halten es angesichts aller dieser Beobachtungen für äußerst unwahrscheinlich, daß mangelnde Steroidverarmung das Fehlen des Effektes verursachte.

Durch das methodische Vorgehen war auch gesichert, daß die verwendeten Steroide unbehindert in das Gewebe diffundieren konnten. Um dies zu erreichen, wurde in den meisten Experimenten wie beschrieben eine isotone Inkubationsphase mit Steroid zwischengeschaltet, während der kein nennenswerter osmotischer Wasserfluß bestand. Zusätzlich wurde in den entsprechend bezeichneten Experimenten Steroid auch zur mucosalen Badeflüssigkeit zugegeben, obwohl die allgemeine Erfahrung gezeigt hat, daß Steroidhormone praktisch ausschließlich von

serosal her einwirken. Schließlich ist noch darauf hinzuweisen, daß Aldosteron, Cortisol und Corticosteron bei *Bufo marinus* endogen gebildet werden (Crabbé 1963a) und daß das synthetische Dexamethason bei *Bufo marinus* eine mineralocorticoide Aktivität ausübt (Handler et al. (1969), Kirsten et al. (1970).

Ad 4) Damit scheinen Speciesunterschiede die einzig mögliche Begründung für den bei *Bufo marinus* fehlenden direkten Steroideffekt auf die osmotische Wasserpermeabilität zu sein. Es existieren unzählige Belege für Speciesunterschiede. So haben die vorliegenden Befunde bereits eine unterschiedliche Ansprechbarkeit von *Bufo bufo*, *Bufo marinus* und *Rana esculenta* gegenüber Vasopressin ergeben. Bereits 1958 haben Morel et al. (1958) über entsprechende Erfahrungen berichtet. Schließlich sind hier die Befunde von Marumo zu zitieren, der bei zwei Krötenarten, wie oben beschrieben, qualitativ unterschiedliche Effekte beobachtete. Weitere Speciesunterschiede sind in einer Übersichtsarbeit von Maetz (1968) diskutiert. Daß unterschiedliche Transportcharakteristiken selbst bei der gleichen Species unterschiedlicher Herkunft (i.e. *Bufo marinus* aus Kolumbien bzw. aus der dominikanischen Republik) auftreten können, ist durch Davies et al. (1968) dokumentiert.

Die eingangs gestellte Frage nach einer direkten, hemmenden Steroidwirkung auf die Wasserpermeabilität im Sinne eines allgemeinen biologischen Prinzipes muß deshalb negativ beantwortet werden.

Dies bedeutet nicht, daß Corticosteroide an der Säugetierniere nicht doch eine direkte permeabilitätshemmende Wirkung entfalten können, wie dies Raisz et al. (1957), Kleeman et al. (1958 u. 1960), Stolte et al. (1967) und Green et al. (1970) postulieren.

Außerdem haben sowohl unsere Daten als auch die Ergebnisse von Fanestil et al. (1967) und Handler et al. (1969) gezeigt, daß Corticosteroide den ADH-Effekt modifizieren können, allerdings im Sinne

einer Steigerung der Wasserpermeabilität . Unsere Versuchsergebnisse, die darauf Bezug nehmen, sind in Abb.15 dargestellt.

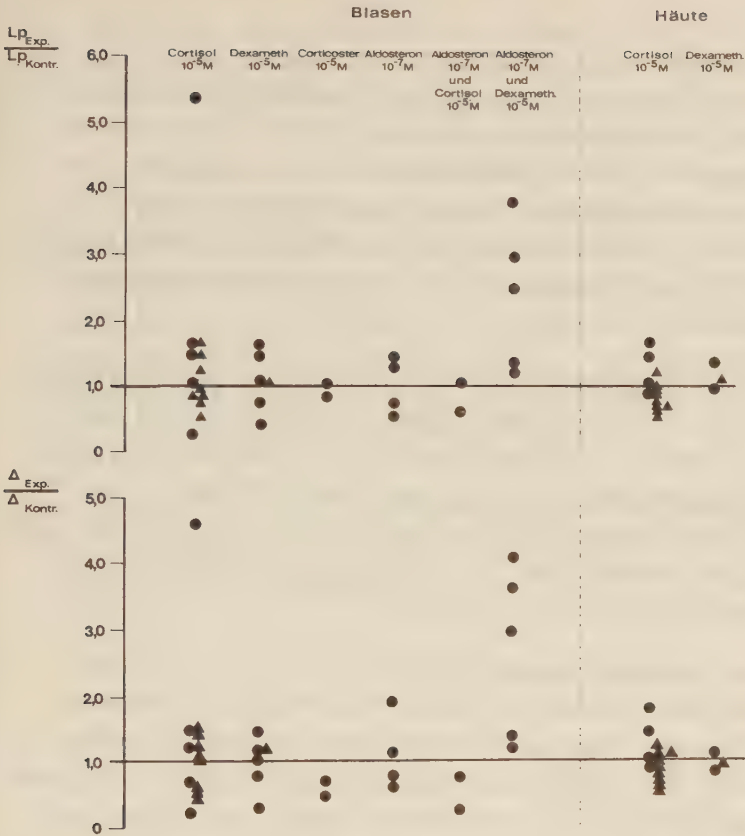


Abb. 15

Einfluß von Corticoiden auf den hydroosmotischen Effekt von Vasopressin auf die Krötenblase von *Bufo marinus*. Obere Kurve: Auf der Ordinate ist der Quotient aus hydraulischer Leitfähigkeit der steroidbehandelten Membran nach ADH-Stimulierung geteilt durch die hydraulische Leitfähigkeit der unbehandelten Membran nach ADH-Stimulierung aufgetragen. Untere Kurve: Hier ist auf der Ordinate der Quotient aus der relativen Änderung der hydraulischen Leitfähigkeit durch ADH aufgetragen. Geteilt wurde die relative Änderung der steroidbehandelten Membran durch die relative Änderung der unbehandelten Membran. Die Vasopressinkonzentration betrug 200 mU/ml; die Steroidkonzentrationen in den einzelnen Gruppen sind in der Abb. angegeben.

- ADH-Effekte ohne gleichzeitige Anwesenheit von Theophyllin.
- ▲ ADH-Effekte mit gleichzeitiger Anwesenheit von Theophyllin ($10^{-2}M$) auf der mukosalen und serosalen Seite.

Z u s a m m e n f a s s u n g

1. Es wurde eine Kammer entwickelt, die volumetrische Messungen des osmotischen Wasserflusses an Amphibienmembranen ermöglicht. Der Vorzug gegenüber bisher angegebenen Kammerarten liegt darin, daß während der volumetrischen Messung im geschlossenen System die Badeflüssigkeiten beider Seiten begast und durchmischt werden können. Weiterhin ist unsere Kammer mit der Kurzschlußstrommeßanordnung nach Ussing (1951) versehen.
2. In Vorversuchen stellte sich heraus daß die Membranen der Kröte *Bufo bufo* nicht sicher auf ADH reagierten. An den Fröschen *Rana esculenta* konnte ein deutlicher Unterschied der Empfindlichkeit gegenüber ADH bei verschiedenen Lieferungen festgestellt werden. Am empfindlichsten gegenüber ADH erwiesen sich die Membranen von *Bufo marinus*. Aus diesem Grunde wurden für unsere Versuche nur die Membranen von *Bufo marinus* verwendet.
3. Um die Membranen gegenüber Steroiden empfindlich zu machen, wurden sie durch Inkubation in steroidfreiem Medium an endogenen Steroiden verarmt. Einen quantitativen Anhalt über das Ausmaß der Verarmung wurde mit ^3H -markiertem Cortisol untersucht. Nach 10-stündiger Inkubation war der Gewebsgehalt an radioaktivem Cortisol auf Werte unter 5 % der anfangs gegebenen Aktivität gesunken.
4. Bei den vorliegenden Versuchen konnten wir keinen permeabilitäts-senkenden direkten Effekt von NNR-H mit glukocorticoider Aktivität auf die hydraulische Leitfähigkeit nachweisen. Geprüft wurden: Cortisol (10^{-4} und 10^{-5} M), Dexamethason (10^{-8} und 10^{-5} M), Aldosteron (10^{-7} M) und vereinzelt Corticosteron (10^{-5} M), außerdem die Kombination von Aldosteron (10^{-7} M) mit Cortisol (10^{-5} M) bzw. Dexamethason (10^{-5} M). Die Hormone wurden dabei einfach sowie mit einer isotonen Inkubationsphase appliziert. Diese beiden Applikationsarten zeigten keinen Unterschied.

5. Gleichzeitige Stimulation der Membranen durch Theophyllin (10^{-2} M) bewirkte ebenfalls keinen Steroideffekt.

6. Das Fehlen einer Permeabilitätssenkung an *Bufo marinus* Membranen kann, wie in der Arbeit ausführlich besprochen, nicht methodisch erklärt werden, da die Membranen, wie gezeigt wurde, erwartungsgemäß auf Vasopressin, auf Theophyllin und auf Aldosteron ansprachen. Aus unseren Daten und der Literatur ist zu schließen, daß ein Speciesunterschied verantwortlich ist. Die Steuerung der Wasserpermeabilität durch NNR-H scheint demnach phylogenetisch kein einheitliches biologisches Prinzip zu sein.

7. Lediglich die kombinierte Verabreichung von Aldosteron und Dexamethason ergab eine erhöhte Ansprechbarkeit von *Bufo marinus* Membranen auf supramaximale Dosen von ADH.

Literatur

- Ahmed, A.B., B.C. George, C.Gonzales-Aubert and J.F. Dingman: Increased plasma arginine vasopressin in clinical adrenocortical insufficiency and its inhibition by glucosteroids. *J.clin.Invest.* 46, 111-123 (1967).
- Bentley, P.J.: The effects of neurohypophyseal extracts on water transfer across the wall of the isolated urinary bladder of the toad *Bufo marinus*. *J.Endocrin.* 17, 201-209 (1958).
- Bentley, P.J.: Directional differences in the permeability to water of the isolated urinary bladder of the toad *Bufo marinus*. *J. Endocrin.* 22, 95-100 (1961).
- Bentley, P.J.: Amyloride: a potent inhibitor of sodium transport across the toad bladder. *J.Physiol.* 195, 317-330 (1968).
- Bourguet, J., et J. Maetz: Arguments en faveur de l'indépendance des mécanismes d'action de divers peptides neurohypophysaires sur le flux osmotique d'eau et sur le transport actif de sodium au sein d'un même récepteur; études sur la vessie et la peau de *Rana esculenta*. *L.Biochim.Biophys.Acta*, 52, 552-565 (1961).
- Bourguet, J. and S.Jard: Un dispositif automatique de mesure et d'enregistrement du flux net d'eau à travers la peau et la vessie des amphibiens. *Biochim.Biophys.Acta*, 88, 442-444 (1964).
- Brouha, A., A. Pequénx, E. Schoffeniels and A. Distèche: The effect of high hydrostatic pressure on the permeability characteristics of the isolated frog skin. *Biochim.Biophys.Acta*, 219, 455-462 (1970).
- Crabbé, J.: Stimulation of active sodium transport across the isolated toad bladder after injection of aldosterone to the animal. *Endocrinol.* 69, 673-682 (1961a).

- Crabbé, J.: Stimulation of active sodium transport by the isolated toad bladder in the aldosterone in vitro. *J.clin.Invest.* 40, 2103-2110, (1961b).
- Crabbé, J.: Nature and metabolism of adrenocortical secretion in the toad *Bufo marinus*. *Gen.comp.Endocrin.* 3, 692-693 (1963a).
- Crabbé, J.: Effects of corticosteroids on sodium transport by, and permeability to water of, a living membrane. *Proc. of the 2 nd Internat.Congress of Nephrology, Prague*, S.548-551 (1963b).
- Crabbé, J. and P.De Weer: Action of aldosterone and vasopressin on the active transport of sodium by the isolated toad bladder. *J.Physiol.* 180, 560-568 (1965).
- Cuthbert, A.W., and E. Painter: Independent action of antidiuretic hormone, theophylline and cyclic 3'-5'-adenosine monophosphate on cell membrane permeability in frog skin. *J.Physiol.London*, 199, 593-612 (1968).
- Davies, Howard E.F., Denis G. Martin and Geoffry W.G.Sharp: Differences in the physiological characteristics of bladders of toads from different geographical sources. *Biochim. Biophys.Acta* 150, 315-318 (1968).
- Dingman, J.F. and R.Despointes: Adrenal steroid inhibition of vasopressin release from the neurohypophysis of normal subjects and patients with Addison's disease. *J.clin.Invest* 89, 1851-1863 (1960).
- Dobson, James G. and George W. Kidder: Edge damage effect in vitro frog skin preparations. *Am.J.Physiol.* 214, 719-724, (1968).

- Edelman, I.S., Rita Bogoroch, and George A. Porter: On the mechanisms of action of aldosterone on sodium transport: the role of protein synthesis. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 50, 1169-1177 (1963).
- Edelman, I.S., M.J. Petersen, and P. Gulyassy: Kinetic analysis of the antidiuretic action of vasopressin and adenosine-3'-5'-monophosphate. *J. clin. Invest.* 43, 2185-2194 (1964).
- Ewer, R.F.: The effect of pituitrin on fluid distribution in BUFO REGULARIS REUSS. *J. exp. Biol.* 29, 173-177 (1952).
- Fanestil, Darell D., George A. Porter, and Isidore S. Edelman: Aldosterone stimulation of sodium transport. *Biochim. Biophys. Acta* 135, 74-88 (1967).
- Ferguson, D.R., J.S. Handler and Jack Orloff: Effect of sodium transport and vasopressin on the oxydation of palmitic acid by the toad bladder. *Biochim. Biophys. Acta* 163, 150-153 (1968).
- Gaunt, J.H. Birnie, and W.J. Eversole: Adrenal cortex and water metabolism. *Physiol. Rev.* 29, 281-310 (1949).
- Gaunt, J.H. : The adrenal cortex in salt and water metabolism. *Res. Progr. Horm. Res.* 6, S. 247 ff (1951).
- Gaunt, J.H., and J.H. Chart: Mineralocorticoid action of adrenocortical hormones. In: *Handbook exp. Pharm., Erg.-Werk*, Bd. 14, Teil 1, Seite 514 ff, Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1962.
- Gfeller, E. and M. Walser: Stretch-induced changes in geometry and ultrastructure of transporting surfaces of toad bladder. *J. Membrane Biol.* 4, 16-28 (1971).

- Green, H.H., A.R.Marrington and H. Valtin: On the role of anti-diuretic hormone in the inhibition of acute water diuresis in adrenal insufficiency and the effects of gluco- and mineralocorticoids in reversing the inhibition. *J.clin. Invest.* 49, 1724-1736 (1970).
- Gulyassy, P.F. and I.S. Edelman: Hydrogen-ion dependence of the antidiuretic action of vasopressin, oxytocin and deamino-oxytocin. *Biochim.Biophys.Acta*, 102, 185-197 (1965).
- Handler, J.S., A.S. Preston and J.Orloff: Effect of adrenal steroid hormones on the response of the toad's urinary bladder to vasopressin. *J.clin.Invest.* 48, 823-833 (1969).
- Hays, R.M., and A. Leaf: Studies on the movement of water through the isolated toad bladder and its modification by vasopressin. *J.Gen.Physiol.* 45, 905-919 (1962).
- House, C.R.: The nature of water transport across frog skin. *Biophys.J.* 4, 401-416 (1964).
- House, C.R.: Secretory response to the stimulation of amphibian skin glands. *Biochim.Biophys.Acta*, 173, 344-347 (1969).
- Kirsten, E., R.Kirsten and G.W.G. Sharp: Effects sodium transport stimulating substances on enzyme activities in the toad bladder. *Pflügers Archiv*, 316, 26-33 (1970).
- Kleeman, C.R., J.Koplowitz, M.H. Maxwell, R.Cutler and J.T. Dowling: Mechanisms of impaired water excretion in adrenal and pituitary insufficiency. II. Interrelationships of adrenal cortical steroids and antidiuretic hormone in normal subjects and in diabetes insipidus. *J.clin.Invest.* 39, 1472-1480, (1960).

- Koefoed-Johnson, V.H. Levi and M.M. Ussing: The mode of passage of chloride ions through the isolated frog skin. *Act.physiol. scand.* 25, 150-163 (1952).
- Kristensen, P.: The action of theophylline on isolated skin of the frog (*Rana temporaria*). *Biochim.Biophys.Acta* 203, 579-582 (1970).
- Leaf, A., J.Anderson and L.B. Page: Active sodium transport by the isolated toad bladder. *J.Gen.Physiol.* 41, 657-668 (1958).
- Leaf, A.: Some actions of neurohypophyseal hormones on a living membrane. *J.Gen.Physiol.* 42:Suppl. 1, 175-189, (1960).
- Leaf, A. and E.F.Dempsey: Some effects of mammalian neurohypophyseal hormones on metabolism and active transport of sodium by the isolated toad bladder. *J.Biol.Chem.* 235, 2160-2163, (1960).
- Lichtenstein, V.S. and A. Leaf: Effect of amphotericin B on the permeability of the toad bladder. *J.Clin.Invest.* 44, 1328-1342 (1965).
- J.Maetz: Salt and water metabolism. Perspectives in endocrinology. Hormones in the lives of lower vertebrates (E.J.W. Barrington and C.B. Jørgensen eds.) Academic Press, New York and London, 47-162 (1968).
- Marumo, Fumaki: The effect of glucocorticoid on the water permeability of the toad bladder. *Pflügers Archiv.* 299, 149-157 (1968).
- de Moor, P., O.Steen, M. Raskin and A.Hendrix: Fluorimetric determination of free plasma 11-hydroxycorticosteroids in man. *Acta Endocrinol.* 33, 297-307 (1960).

- Morel, F., J.Maetz, et Cl. Lucarain: Action des deuxpeptides neurohypophysaires sur le transport activ de sodium et le flux net d' eau à travers la peau de diverses espèces de batraciens anoures. *Biochim.Biophys.Acta* 28, 619-626 (1958).
- Marayama, Y., A. Suzuki, M. Tadsoro and F. Sakai: Mikroperfusion of Henles loop in the kidney of the adrenalectomized rat. *Jap.J.Pharmac.* 18, 518-519 (1968).
- Natochin, Yu.v., E.I. Shakmatova, E.A. Lavrova: The effect of water flow according to osmotic gradient on the transport of water and sodium through the wall of urinary bladder and skin of frog. *Biophysica* 15, 1029-1035 (1970).
- Nutburne, D.M.: The effect of small hydrostatic pressure gradients on the rate of active sodium transport across isolated living frogskin membranes. *J.Physiol.* 195, 1-18 (1968).
- Orloff, J., J.S. Handler, A. Scott Preston: The similarity of effects of vasopressin, adenosine-3'-5'-phosphate (cyclic AMP) and the theophylline on the toad bladder. *J.clin.Invest.* 41, 702-709, (1962).
- Parisi, M. P. Ripoche et J. Bourguet: Une preparation de l'épithelium isolé de la vessie de grenouille. Response à l'oxytocine, an 3'-5'-adénosine-monophosphate cyclique et à la theophylline. *Pflügers Archiv* 309, 59-69 (1969).
- Peters, G.: *Nehennierenrinden-Inkretion und Wasser-Elektrolythaushalt.* Leipzig:G.Thieme 1960.
- Porter, G.A. and I.S.Edelman: The action of aldosterone and related corticosteroids on sodium transport across the toad bladder. *J.clin.Invest.* 43, 611-620 (1964).

- Raisz, L.G., W.F. Mc Neely, L.Saxon and J.D.Rosenbaum: The effects of cortisone and hydrocortisone on water diuresis and renal function in man. *J.clin.Invest.* 36, 767-779 (1957).
- Sawyer, W.M. and Schisgall, R.M.: Increased permeability of the frog bladder to water in response to dehydration and neurohypophyseal extracts. *Am.J.Physiol.* 187, 312-314 (1956).
- Sharp, G.W.G. and A.Leaf: Biological Action of aldosteron in vitro. *Nature* 202, 1185-1188 (1964).
- Stackelberg, W.F.v: Der Einfluß hydrostatischer Druckdifferenzen auf den aktiven Natriumtransport durch die Froschhaut. *Pflügers Archiv* 310, 128-136 (1969).
- Steen, W.B.: On the permeability of the frog's bladder to water. *Anat.Rec.* 43, 215-220 (1929).
- Stolte, H., J.P.Brecht, M.Wiederholt und K.Hierholzer: Einfluß von Adrenalektomie und Glucocorticoiden auf die Wasserpermeabilität corticäler Nephronabschnitte der Rattenniere. *Pflügers Archiv*, 299, 99-127 (1968).
- Vecli, A. and B. Biandu: Water transport across isolated frog skin: A critical review of previous techniques and some new experimental results. *Arch.Sci.biol.* 50, 242-250 (1966).
- Vecli, A., A.Biandu e S. Ferioli: Un metodo gravimetrico per la misura del flusso d'acqua attraverso la pelle isolata di rana. *Boll.Soc.ital.Biol.sper.*, 42, 1858-1862 (1966).
- Ussing, H.H. and K. Zehran: Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta physiol.Scand.* 29:110-127 (1951).

Herrn Professor Dr. K. Hierholzer danke ich für die
Überlassung des Themas, die stets freundlich gewährte
Anleitung am Experiment sowie die Durchsicht des
Manuskriptes.

L e b e n s l a u f

Am 21. Dezember 1944 wurde ich als Sohn des Nervenarztes Dr.med. Hemmo Müller-Suur und seiner Frau Gisela, geb. Zelle, in Allenstein in Ostpreußen geboren.

Von 1950 bis 1954 besuchte ich die Grundschule in Göttingen und anschließend das humanistische Gymnasium. Nach bestandenem Abitur 1964 begann ich mein Medizinstudium. Zunächst studierte ich ein Jahr an der Universität Göttingen und legte dort das Vorphysikum ab. Das restliche Studium wählte ich an der Freien Universität Berlin, wo ich die ärztliche Vorprüfung 1966 und das Staatsexamen 1970 mit Erfolg absolvierte.

Während meines klinischen Studiums arbeitete ich unter Leitung von Herrn Prof.Dr.K.Hierholzer im Physiologischen Institut zur Fertigstellung der Dissertation.

Nach Ableistung der Medizinalassistentenzeit wurde ich am 8. September 1971 als Arzt approbiert. Seitdem arbeite ich als wissenschaftlicher Assistent in der Arbeitsgruppe Prof.Dr. K.Hierholzers im Institut für Klinische Physiologie im Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin. Thema dieser Arbeitsgruppe ist die kontinuierliche hydrostatische Druckmessung an Nierentubuli.

Druck:

Der Präsident der Freien Universität Berlin
- Universitätsdruckerei -

1 Berlin 41, Kelchstraße 31

